

FACULTAD DE CIENCIAS

CAMPUS DE PUERTO REAL



Clonación y caracterización estructural y funcional del cDNA de  
la enzima 15S-Lipoxigenasa (EC 1.13.11.33) de lubina  
(*Dicentrarchus labrax*)

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CURSO 2016/2017

LAURA MUÑOZ LUQUE

TUTORES:

ALMUDENA GONZÁLEZ ROVIRA  
CARLOS PENDÓN MELÉNDEZ



*Gracias a mis tutores:*

*Almudena, por tu paciencia, por tener siempre tiempo para mí y por esa alegría tan contagiosa que desprendes absolutamente todos los días. Espero que siempre siga ahí.*

*Carlos, por estar siempre dispuesto a enseñarme algo nuevo y resolver mis dudas siempre con humor.*



## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
3.1. ÁCIDOS GRASOS.....	3
3.2. LA LUBINA EUROPA ( <i>DICENTRARCHUS LABRAX</i> ) .....	6
3.3. LIPOXIGENASA.....	8
3.4. ANTECEDENTES .....	9
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>5. METODOLOGÍA .....</b>	<b>13</b>
5.1. BÚSQUEDA EN LAS BASES DE DATOS .....	13
5.2. DISEÑO DE PRIMERS .....	14
5.3. EXTRACCIÓN DE RNA .....	15
5.4. PURIFICACIÓN DEL RNA Y TRATAMIENTO CON DNASAS .....	15
5.5. SÍNTESIS DE CDNA MEDIANTE RT-PCR.....	15
5.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CDNA MEDIANTE RT-QPCR.....	16
5.7. OBTENCIÓN DEL CDNA DE LA ENZIMA MEDIANTE PCR.....	17
5.8. AISLAMIENTO DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA .....	18
5.9. LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN.....	18
5.10. SELECCIÓN DE CLONES Y AISLAMIENTO DE LOS PLÁSMIDOS.....	20
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>23</b>
6.1. BÚSQUEDA EN LAS BASES DE DATOS .....	23
6.2. DISEÑO DE PRIMERS .....	26
6.3. EXTRACCIÓN DE RNA .....	26
6.4. PURIFICACIÓN DEL RNA Y TRATAMIENTO CON DNASAS .....	26
6.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CDNA MEDIANTE RT-QPCR.....	27
6.6. OBTENCIÓN DEL CDNA DE LA ENZIMA .....	28
6.7. LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN.....	32
6.8. SELECCIÓN DE CLONES Y AISLAMIENTO DE LOS PLÁSMIDOS .....	32
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>8. PERSPECTIVAS DE FUTURO.....</b>	<b>37</b>

BIBLIOGRAFÍA.....	39
ABREVIATURAS.....	43
ANEXOS.....	45
ANEXO 1.....	45
ANEXO 2.....	45
ANEXO 3.....	48
ANEXO 4.....	51
ANEXO 5.....	51
ANEXO 6.....	51
ANEXO 7.....	51

## 1. RESUMEN

La lipoxigenasa (LOX) es una enzima clave en el metabolismo de los ácidos grasos, ya que está implicada en la biosíntesis de leucotrienos a partir de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) ácido araquidónico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Los leucotrienos forman parte de los eicosanoides, que son un grupo de compuestos con funciones muy importantes en el organismo. Actúan como mediadores en el sistema nervioso central y modulan las respuestas inflamatoria e inmune.

La lipoxigenasa ha sido descrita en muchos organismos, pero no para los peces, donde adquiere especial importancia en la acuicultura debido a que el cambio en la alimentación de los peces afecta al metabolismo de los ácidos grasos.

En este proyecto se ha clonado el extremo 5' del gen de la enzima 15S-Lipoxigenasa en la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*). A partir de la secuencia predicha para la lipoxigenasa en el organismo *Oreochromis niloticus*, relacionado filogenéticamente con *D. labrax*, se han diseñado primers específicos y se ha amplificado mediante PCR un fragmento de cDNA con el tamaño esperado. Finalmente, se han obtenido tres clones con plásmidos que contienen el inserto del tamaño adecuado.

## 2. ABSTRACT

Lipoxygenase (LOX) is a key enzyme in fatty acid metabolism since it is involved in the biosynthesis of leukotrienes from the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). Leukotrienes are eicosanoids, a group of compounds which performs critical functions in the organism. They act as mediators in the central nervous system and modulate the inflammatory and the immune response.

Lipoxygenase has been described for many organisms, but not for fishes, where it is particularly important in aquaculture due to the fact that the change in fish feeding affects the fatty acid metabolism.

In this project the 5' end of the 15S-Lipoxygenase enzyme gene has been cloned in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). By using the predicted sequence for lipoxygenase in the organism *Oreochromis niloticus*, phylogenetically related to *D. labrax*, specific primers have been designed and a cDNA fragment with the expected size has been amplified by PCR. Finally, three clones were obtained with plasmids containing the insert of the appropriate size.





### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son las unidades básicas de la mayoría de los lípidos que, junto con los carbohidratos y las proteínas, conforman los tres componentes principales de la materia biológica. Además, forman parte de las membranas celulares, estando presentes en los fosfolípidos. Por otro lado, también son importantes sustratos energéticos, constituyendo aproximadamente el 30% del consumo total de energía para los seres humanos <sup>[1]</sup>.

Consisten en un grupo carboxilo hidrófilo unido a un extremo de una cadena hidrocarbonada, a menudo larga (entre 2 y 36 átomos de carbono) y generalmente con número par de carbonos. En el otro extremo de la cadena se encuentra un grupo metilo <sup>[2]</sup>.

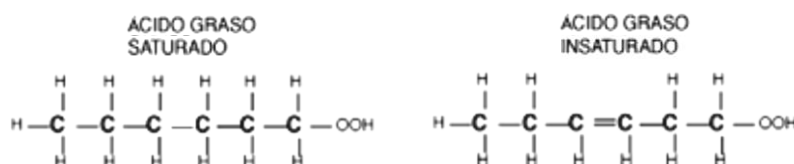


Figura 3.1: Estructura básica de los ácidos grasos <sup>[2]</sup>.

##### 3.1.1. Clasificación de los ácidos grasos

Los ácidos grasos se clasifican de distintas formas según su estructura, papel fisiológico o efectos biológicos. Según su estructura, una de las clasificaciones más importantes, se dividen en ácidos grasos saturados e insaturados:

Los **ácidos grasos saturados** no contienen dobles enlaces y, a su vez, se dividen en subgrupos según su longitud. Pueden ser **ácidos grasos saturados de cadena corta** (Short Chain Fatty Acids, SCFA), como el ácido propiónico; **ácidos grasos saturados de cadena media** (Medium Chain Fatty Acids, MCFA), como el ácido hexanoico, o **ácidos grasos saturados de cadena larga** (Long Chain Fatty Acids, LCFA), como el ácido palmítico y el esteárico.

Por otro lado, los **ácidos grasos insaturados** se dividen según el número de insaturaciones en **monoinsaturados**, cuando contienen solo un doble enlace; **poliinsaturados** (Poly Unsaturated Fatty Acids, PUFAs), cuando contienen dos dobles enlaces o más y **altamente insaturados** (Highly Unsaturated Fatty Acids, HUFAs), cuando contienen más de tres dobles enlaces. Esta no es una clasificación estricta, ya que los HUFAs se consideran un tipo de PUFAs y se les nombra de ambas formas.

A su vez, los ácidos grasos insaturados pueden dividirse según su isomería en **cis** y **trans** <sup>[3]</sup>.

En cuanto a su **nomenclatura**, los ácidos grasos suelen tener un nombre sistemático y un nombre común. Por ejemplo, el ácido octadecanoico tiene como nombre común ácido esteárico. Se suele utilizar la notación abreviada: CN:p n-x, donde CN representa el número total de átomos de carbono, p el número de enlaces dobles y n la posición del primer doble enlace, contando a partir del metilo terminal (cadena normal, n). Por ejemplo, el ácido linoleico sería 18:2n-6. También se expresa la posición del primer doble enlace contando desde el extremo carboxílico, indicado como la posición  $\Delta$  <sup>[4]</sup>. Así, el ácido linoleico sería 18:2 $\Delta$ 9,12.

Otra forma de nombrarlos es con la nomenclatura  $\omega$ , letra griega con la que se designa al último carbono de la cadena (carbono metílico). Se clasifican según el carbono donde esté el primer doble enlace contando desde el carbono  $\omega$ , dividiéndose en: **ácidos  $\omega_3$**  (ácidos linolénico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico), **ácidos  $\omega_6$**  (ácidos linoleico y araquidónico) y **ácidos  $\omega_9$**  (ácido oleico) <sup>[2]</sup>.

### 3.1.2. *Metabolismo de los ácidos grasos*

Los ácidos grasos se sintetizan en el citoplasma de las células gracias al complejo multienzimático ácido graso sintasa o FAS (Fatty Acid Synthase), que usa como sustrato el malonil-CoA. Este complejo va añadiendo carbonos de dos en dos hasta llegar a un ácido graso de 16 C (ácido palmítico) <sup>[5]</sup>. Dado que la célula requiere ácidos grasos de cadena más larga e insaturados, se producen rutas metabólicas de elongación y desaturación que dan lugar, a partir del ácido palmítico, a derivados de ácidos grasos con diferentes funciones <sup>[2]</sup>.

Sin embargo, no todos los ácidos grasos pueden sintetizarse de novo en todos los organismos. En humanos, en peces y en vertebrados en general, debido a la falta de las desaturasas  $\Delta$ 12 y  $\Delta$ 15, no pueden sintetizarse los **ácidos linoleico** (LA, 18: 2n-6) y  **$\alpha$ -linolénico** (LNA; 18: 3n-3). Éstos son los llamados **ácidos grasos esenciales**, se les considera los ácidos grasos parentales para las familias de PUFAs  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 y deben ingerirse en la dieta <sup>[6]</sup>.

Estos ácidos grasos son importantes constituyentes de las membranas celulares: aportan las propiedades de fluidez, determinando el comportamiento de las enzimas y receptores acoplados a la membrana. Algunas de sus funciones requieren su conversión a otros productos, pero en la mayoría de los casos los mismos ácidos grasos parecen estar activos <sup>[7]</sup>.

Los ácidos grasos esenciales pasan por elongaciones y desaturaciones para dar lugar a HUFAs de cadena larga, como los **ácidos eicosapentaenoico** (EPA, 20: 5n-3), **docosahexaenoico** (DHA, 22: 6n-3) y **araquidónico** (AA, 20: 4n-6). En humanos y en peces, estas transformaciones son posibles pero no se producen de manera muy eficiente, por lo que estos ácidos pueden caracterizarse como condicionalmente esenciales, dependiendo de la disponibilidad de los esenciales <sup>[1]</sup>.

### 3.1.3. Derivados de los ácidos grasos esenciales

La importancia de estos compuestos radica en que, además de formar parte de las membranas, mediante la actividad de enzimas **ciclooxigenasas** y **lipoxigenasas** dan lugar a una serie de compuestos que regulan una amplia variedad de respuestas fisiológicas y procesos patológicos, los **eicosanoides**.

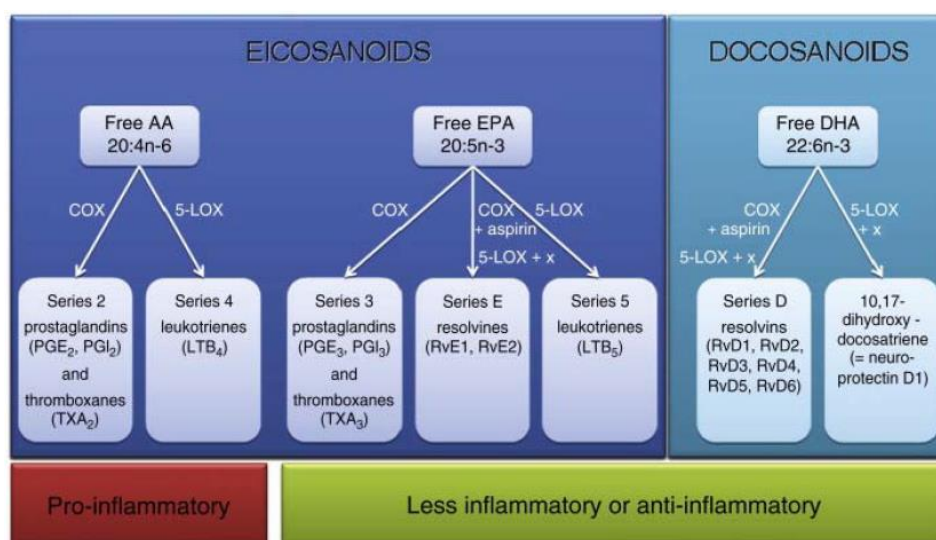


Figura 3.2: Esquema de la vía de biosíntesis de los eicosanoides y docosanoides a partir de AA, EPA y DHA libres [2].

Los eicosanoides incluyen a los **tromboxanos (TXAs)**, **prostaglandinas (PGs)** y **leucotrienos (LTs)**. Son moléculas de señalización lipídicas que ejercen sus efectos mayormente mediante interacciones locales con la membrana celular o nuclear [8]. Estas moléculas influyen en procesos tan dispares como la vasoconstricción, vasodilatación, náuseas y diarrea, inhibición de la secreción de ácidos gástricos, filtración y flujo sanguíneo renal... También regulan procesos inmunológicos importantes como la diferenciación y el crecimiento celular, la producción de citoquinas, la formación de anticuerpos y la presentación de antígenos [9, 10, 11].

La producción de los eicosanoides aumenta considerablemente durante la inflamación y en situaciones de estrés [12].

### 3.1.4. Fuentes de ácidos grasos esenciales

Los peces son la fuente de ácidos grasos esenciales (LA y LNA) y altamente insaturados (AA, EPA y DHA) más importantes en la dieta humana. Dado que estos lípidos son muy importantes para la salud, la ingesta regular de pescado forma parte de una dieta saludable [13, 14]. Una de las especies más producida y consumida en España es **la lubina**, como se detalla en el *Apartado 3.2*.

### 3.2. LA LUBINA EUROPA (*DICENTRARCHUS LABRAX*)

La lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) es un pez teleósteo carnívoro de la clase Osteíctios, orden Perciformes de la familia Moronidae. Posee un cuerpo fusiforme y vigoroso con grandes escamas y una cabeza puntiaguda con mandíbula inferior algo prominente. Su coloración es gris plumizo, más oscura en la parte dorsal y con los laterales plateados. Alcanza un tamaño de hasta 70 cm de longitud.

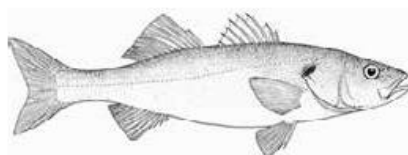


Figura 3.3: *Dicentrarchus labrax* <sup>[15]</sup>.

Es una especie litoral pelágica que se distribuye por las costas orientales del océano Atlántico, Canal de la Mancha, mar Báltico y por todo el mar Mediterráneo. Suele frecuentar los estuarios y lagunas litorales, tolerando grandes variaciones de temperatura y de salinidad del agua.

En cuanto a su cultivo, se cría en casi todos los países mediterráneos produciendo huevos a partir de individuos reproductores en condiciones muy controladas. Las instalaciones son muy variadas: viveros flotantes en el mar, tanques de hormigón o estanques en tierra.

Según el informe APROMAR sobre *La acuicultura Marina de Peces en España 2016*, la lubina (*Dicentrarchus labrax*) es la segunda especie más producida en acuicultura en España en 2014, seguida de la dorada (*Sparus aurata*). La producción de lubina de acuicultura en 2015 ha sido de 21324 toneladas, un 22.7% más que en 2014. En Europa y el Mediterráneo en 2015 también ha aumentado la producción acuícola de lubina respecto al año anterior <sup>[15]</sup>.

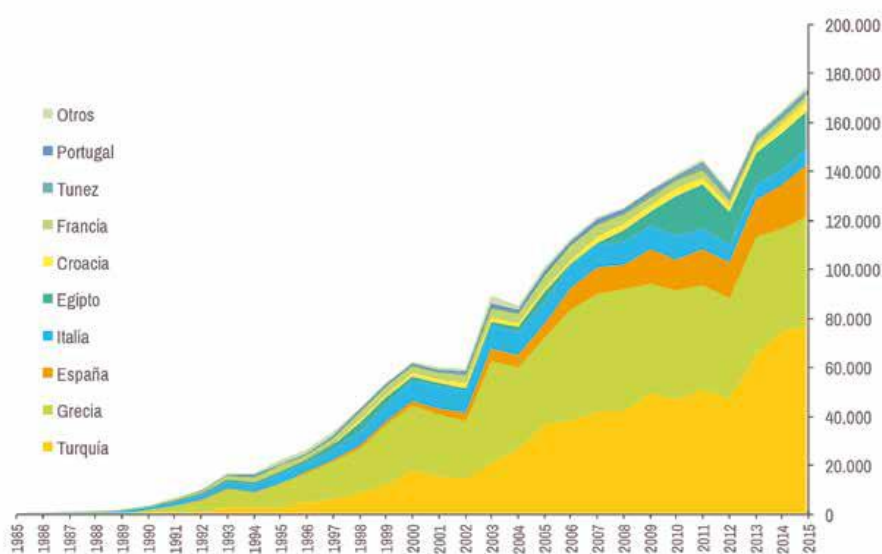


Figura 3.4: Evolución de la producción total de lubina de acuicultura entre 1985-2015 <sup>[15]</sup>.

Dada su **importancia comercial**, se está intentando caracterizar el metabolismo de esta especie. Esto es muy importante para controlar la alimentación en la acuicultura, que es determinante para el crecimiento de los peces y los gastos económicos.

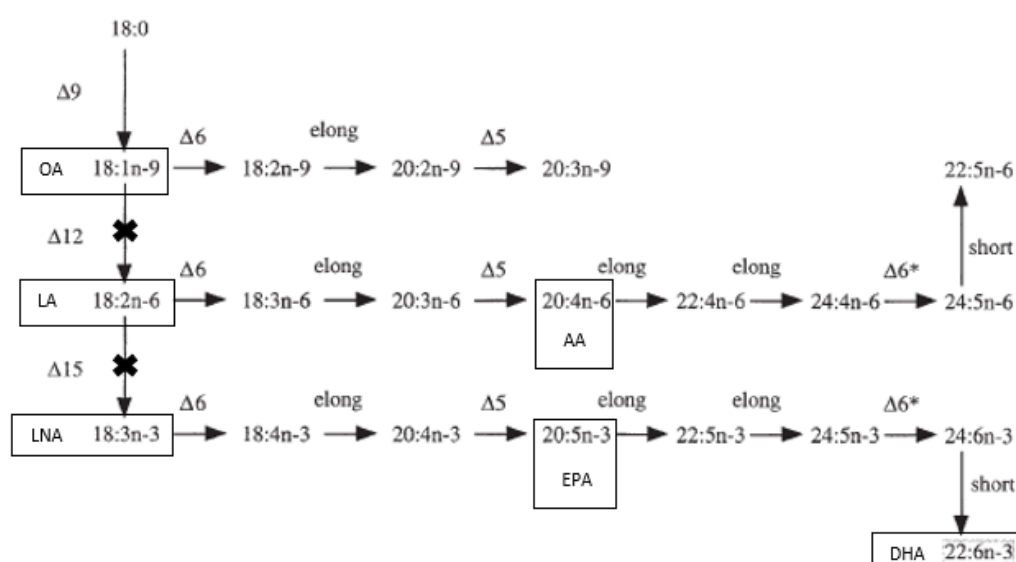
En diversos estudios de peces marinos se ha concluido que la vía de transformación desde los ácidos grasos esenciales (LNA y LA) hasta los HUFAs (AA, EPA y DHA) es altamente inefectiva <sup>[16, 17, 18]</sup>. Esto se debe al medio en el que se desarrollan naturalmente, rico en HUFAs y con bajos niveles de ácidos grasos esenciales <sup>[19]</sup>.

En la **acuicultura** se modifica la alimentación natural de los peces. La dieta a base de harinas de pescado y aceites de las pesquerías no es sostenible (aunque si funciona bien como fuente de proteínas y lípidos) <sup>[20]</sup>, por lo que se están buscando nuevas dietas rentables a pesar de las limitaciones de síntesis de HUFAs. Para ello, debe conocerse el metabolismo de los ácidos grasos en los peces marinos <sup>[2]</sup>.

### 3.2.1. Metabolismo de ácidos grasos en la lubina

Todos los vertebrados, incluidos los peces, carecen de las desaturasas  $\Delta 12$  y  $\Delta 15$ , por lo que deben adquirir de la dieta los **ácidos grasos esenciales**. Además, en los peces marinos, la transformación de los ácidos grasos esenciales es ineficaz también, por lo que necesitan adquirir los productos de dichas transformaciones en la dieta <sup>[12, 21, 22]</sup>.

La ruta metabólica de síntesis de HUFAs propuesta en peces aparece en la *Figura 3.5*.

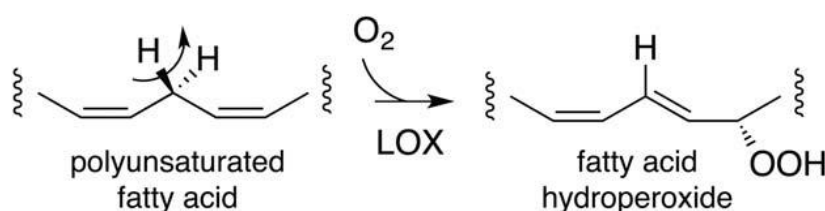


*Figura 3.5: Vía de síntesis de HUFAs a partir de sus precursores en peces <sup>[19]</sup>.*

### 3.3. LIPOXIGENASA

Las **lipoxigenasas** (LOXs, EC 1.13.11.12, linoleate oxygen oxidoreductase) forman una familia de enzimas que catalizan la **dioxigenación de ácidos grasos poliinsaturados** (PUFAs). Son enzimas oxidorreductasas que contienen hierro no hemo y son ubicuas en plantas y en animales. Por otro lado, no se expresan en bacterias ni levaduras <sup>[23]</sup>.

Las LOXs catalizan la dioxigenación regional y estereoespecífica de los PUFAs que contienen un sistema (1Z, 4Z)-pentadieno, como LA, LNA o AA <sup>[24]</sup>. Se clasifican según la especificidad posicional de oxigenación del ácido araquidónico, encontrándose por ejemplo 5-LOX, 8-LOX, 11-LOX, 12-LOX y 15-LOX. También se clasifican según la estereoespecificidad de la reacción en S- o R-Lipoxigenasas <sup>[25]</sup>.



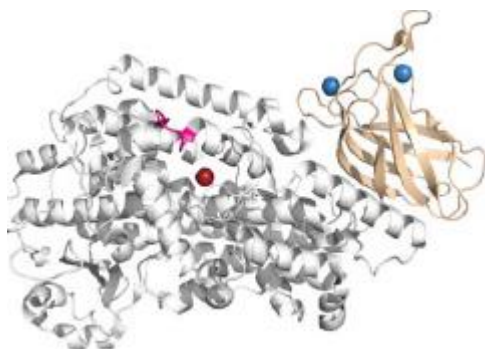
*Figura 3.6: Esquema de la reacción de dioxigenación llevada a cabo por la lipoxigenasa <sup>[26]</sup>.*

#### 3.3.1. Estructura de la lipoxigenasa

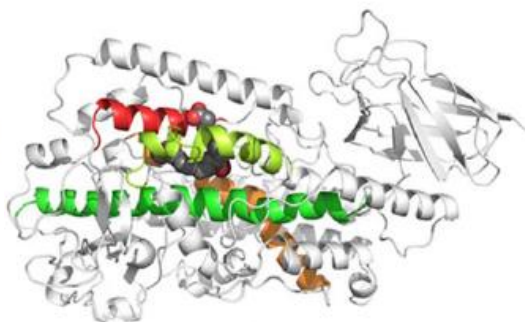
Las lipoxigenasas están compuestas por una única cadena polipeptídica. La primera estructura cristalina descrita de una LOX estableció el marco molecular común a las enzimas vegetales y animales: están compuestas por un **β-barril amino-terminal**, el dominio PLAT (Polycystin-1, Lipoxigenasa, Alfa-Toxina) y un **dominio carboxilo terminal α-helicoidal** mucho mayor, que contiene el sitio activo con el hierro no-hemo catalítico <sup>[26]</sup>.

Las enzimas vegetales son significativamente más grandes que las enzimas animales, pero se conserva el núcleo helicoidal grande, junto con las ubicaciones relativas de la mayor parte de las 17 α-hélices que lo componen (*Figura 3.7*).

En el núcleo del dominio helicoidal se encuentra el hierro catalítico. El núcleo está formado por cuatro hélices que aportan los aminoácidos invariantes de unión al hierro (*Figura 3.8*). Los aminoácidos del núcleo también forman el sitio de unión del ácido graso <sup>[27]</sup>.



**Figura 3.7:** Estructura básica de la lipoxigenasa, con las alfa-hélices alrededor del centro activo y el dominio terminal PLAT, que puede contener sitios de unión para  $\text{Ca}^{2+}$  [27].



**Figura 3.8:** Estructura del núcleo del dominio carboxilo terminal en la lipoxigenasa, con las cuatro hélices que lo forman coloreadas [27].

El **sitio activo** se encuentra en el centro del dominio más grande. La esfera de coordinación adopta una geometría octaédrica distorsionada: el hierro está coordinado por tres histidinas y el aminoácido de isoleucina terminal del dominio helicoidal. Dos posiciones adyacentes no se encuentran ocupadas por ligandos y dejan un hueco libre, que parece ser el lugar donde se da la interacción con el sistema 1,4-dieno del sustrato y con el oxígeno molecular durante la catálisis [27].

El hierro desempeña un papel esencial dentro de la acción catalítica de esta enzima, ya que alterna entre los estados de oxidación  $\text{Fe(II)}$  y  $\text{Fe(III)}$  durante el proceso catalítico [26].

La mayoría de la información que se posee sobre esta enzima proviene de mamíferos y, sobre todo, de plantas. Dada su importancia biológica se están empezando a estudiar sus características en otros organismos, como los peces.

### 3.4. ANTECEDENTES

El presente trabajo se ha realizado en el laboratorio del Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública de la Universidad de Cádiz. En el grupo de investigación se está trabajando desde hace años en el metabolismo de los PUFAs, a partir del proyecto de investigación titulado “Análisis Molecular del Metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs): influencia nutricional y hormonal sobre la síntesis de PUFAs”, proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía. De este proyecto han derivado diversos trabajos, entre los cuales uno de los objetos de estudio es el de la 15S-Lipoxigenasa de la lubina europea (*D. labrax*).

Hasta el momento, se había obtenido una secuencia consenso de 1151pb para el extremo 3' del mRNA del gen de la 15S-Lipoxigenasa [28].





#### 4. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente TFG es la obtención del cDNA completo del gen de la 15S-Lipoxigenasa de la lubina europea (*D. labrax*). Para ello se propusieron los siguientes objetivos más específicos:

1. Estudio e identificación de las secuencias de cDNA codificantes de 15S-Lipoxigenasa de peces, disponibles en la base de datos del NCBI.
2. Selección de la secuencia de cDNA de una 15S-Lipoxigenasa rastreadora.
3. Búsqueda de entradas en la base de DNA genómico de lubina de una secuencia de DNA con alta homología a la secuencia rastreadora.
4. Diseño de primers para la clonación del extremo 5' del cDNA de la 15S-Lipoxigenasa.
5. Obtención del extremo 5' del cDNA de la 15S-Lipoxigenasa mediante amplificación por PCR.
6. Clonaje, secuenciación y estudio de la secuencia de nucleótidos del fragmento obtenido.
7. Obtención por PCR, clonación y secuenciación del cDNA completo de la 15S-Lipoxigenasa.

Debido a la complejidad del proyecto, se llegó hasta el clonaje de la secuencia de nucleótidos del fragmento obtenido.



## 5. METODOLOGÍA

En el presente trabajo se partió de una secuencia consenso de 15S-Lipoxigenasa de lubina, a partir de la cual se realizó una **búsqueda en las bases de datos** disponibles para encontrar una secuencia de 15S-Lipoxigenasa rastreadora (de otra especie). Con ella, se encontró en el genoma de *D. labrax* una secuencia con alta homología y se localizó el extremo 5', fragmento no caracterizado. Entonces, se procedió al **diseño de primers** específicos en esa zona para la **obtención del cDNA** mediante PCR.

Para llevar a cabo la PCR se necesita DNA molde, que se consiguió mediante la **extracción de RNA** a partir de células embrionarias de *D. labrax*. El RNA obtenido se **purificó**, se **trató con DNasas** y a partir de él se **obtuvo cDNA** mediante RT-PCR, que también **se purificó**. La expresión del cDNA obtenido se estudió mediante RT-qPCR.

Una vez obtenido el fragmento, se llevó a cabo el **aislamiento de DNA** a partir de los geles de agarosa. Con esta secuencia de DNA se realizó la **ligación y transformación** de bacterias competentes, para luego **purificar los plásmidos** y obtener los clones.

### 5.1. BÚSQUEDA EN LAS BASES DE DATOS

Para la búsqueda del gen de la 15S-Lipoxigenasa en la lubina europea se partió de la secuencia consenso obtenida previamente por el grupo de investigación <sup>[28]</sup>:

```
GTGAAAGCAAACACCATCAATGGAAAGAAGCAGTACTTGATGGCTCCTCTCGTCCTGCTCCACAAAACACCAGAT
GATGAGCTGATGCCAATTGCTATTCAGCTGAAGCAGACTCCAGCAGAGGACAATCCCATCTTCTTTCTACTGAT
TCTGAGTACGACTGGTTGACGGCCAAGATTTTTGTGAGAAGTGCAGACTTCAGTGAGCATCAACTTAATGTTTAC
CTGCTGCGCACTCACCTGCTGGCTGAAGTGTTCAGTCTCACTGCTGCGCAACATTCCCATGGTGCATCCACTG
TACAAGCTCTTCATTCCCCACACTCGCTACACTCTGCAGATCAACTTCTTGGCTCGACTCCTCCTAATATCTAAG
GATGGAGTTTTTACACAGTTTGCAGCCTCTGGTGGAGAGGGTATGATCACAATCCTGAAGAGATCACTGTCCTCA
ATGACCTACAGTTCCCTCTGCATGCCAGATGACATTGCTGAGCGTGGGCTGGAGTGTGTGCCAAACTTCTACTAC
AAAGATGACGGACTCAGACTTTGGGATATCATCCACAGTTTGTGCAGGGAGTTCTCAGCTACTACTACAAGACT
GACGCTGAGGTCCAGCAAGACTCTGAACTGCAGAAGTGGATTTTGGACATTTTCGAACAGGGATTCTTTCCAA (
C/T) GCAGACACAGGAATTCCACAGAGCTTTACCACCGTGGCTGAGTTGATCCAGTTTGTCAACCATGGCGATCTT
CACAAGCTCAGCACAGCACGCGGCTGTGAATTCTGGACAGTTTGAATATGGTGGCTGGATGCCCCAACACTCCCAT
CTCCCTGCAACGTCCTCCACCAACCACAAAGGGGACAACAAGCGAGGCCACGATGCTGCAGACATTCCCTGCTGT
CAACACAACAGTTCAGGGAATGGCCACCATGTGGCTACTCAGCAGACAGTCTCTGACTTCGTCCCTCTTGGCCA
TTACCCAGAGGACCATTTCACGAGGAGATTCCCTGCAAGCTGGTGAAGGATTTTCAAGGAGAGCTTAAAGTGTT
AAGTGAAGCCATAAAAGTCAGAAACAAGAGCCTGGAAGTTCCATACACATACATGGATCCAACGGAGGTAGAAAA
TAGTGTGGCCATTTGAAAATCAGGTGGTGT
```

Mediante la herramienta **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool), del NCBI (National Center of Biotechnology Information) se buscaron secuencias de otros organismos con altos niveles de similitud. Se obtuvieron alineamientos con secuencias de 15S-Lipoxigenasa.

Una vez encontrada una secuencia adecuada, que se mencionará en el *Apartado 5.2*, se seleccionó un pequeño fragmento desde el principio hasta, aproximadamente, unos 30 nucleótidos de la zona que coincide con la secuencia obtenida anteriormente. Este fragmento es la secuencia rastreadora, la empleada para realizar la búsqueda a nivel genómico en la lubina y localizar el extremo 5' del cDNA.

Antes de realizar la búsqueda y como comprobación adicional, se realizó una comparación de la secuencia de aminoácidos traducida de la secuencia de *O. niloticus* y la secuencia de aminoácidos obtenida en la investigación anterior. La traducción de la secuencia se obtuvo mediante la herramienta informática **EXPASY**, que traduce secuencias de nucleótidos a secuencias de aminoácidos.

Los distintos alineamientos obtenidos con el genoma de la lubina se ordenaron y se compararon entre ellos para poder realizar el diseño de los primers. Esto se realizó mediante el uso de la herramienta informática **Clustalw: Multiple Sequence Alignment**, que alinea secuencias de DNA y de proteínas. Así, se obtuvo la secuencia a partir de la cual se diseñaron los primers.

## 5.2. DISEÑO DE PRIMERS

Una vez identificada la secuencia en el genoma de la lubina, se diseñaron primers forward específicos para la secuencia en la zona anterior al inicio de transcripción (ATG) y primers reverse, específicos para la secuencia obtenida en la investigación anterior.

Los cebadores o primers flanquean el segmento de DNA que se va a amplificar específicamente mediante PCR. El diseño de los primers se llevó a cabo mediante el uso de programas bioinformáticos: **OligoAnalizer 2.1** y **OligoExplorer 2.1**. En su diseño, deben tenerse en cuenta ciertas características:

- **Longitud del oligonucleótido:** la longitud ideal se encuentra entre 18-24 bases. La diferencia entre la longitud del primer forward y el reverse no debe ser mayor de 3 nucleótidos.
- **Temperatura de fusión (T<sub>m</sub>):** lo ideal es que esté entre 50-62°C. La diferencia entre las temperaturas de fusión de ambos primers no debe ser mayor de 5°C.
- **Especificidad:** deben elegirse los primers con una secuencia única en el molde.
- **Presencia de secuencias complementarias:** ya sea en un mismo primer (self-annealing) o entre ambos (primers dimers), deben evitarse homologías en más de 3 pares de bases.
- **Contenido en G/C y regiones de polipirimidinas o polipurinas:** la composición en GC debe ser aproximadamente de 45-55%. Deben evitarse las zonas poli-dG, poli-dC, poli-dA y poli-dT.
- **Composición de nucleótidos en el extremo 3':** dado que las uniones GC son más estables que las AT, deben incluirse 2-3 residuos G o C en las últimas bases del extremo 3' (60-70% GC) <sup>[29]</sup>.

### 5.3. EXTRACCIÓN DE RNA

Se realizó la extracción de RNA a partir de células embrionarias de lubina europea mediante el **reactivo TRIsure**, según las instrucciones del fabricante. Sin embargo, las centrifugaciones a 4°C se sustituyeron por centrifugaciones a temperatura ambiente. TRIsure, una mezcla de fenol y otros componentes, mantiene la integridad del RNA mientras que hace colapsar las células y disuelve componentes celulares.

Una vez extraído el RNA se llevó a cabo su **cuantificación** (en tres tubos diferentes) mediante el uso de **NanoDrop 2000** de Thermo SCIENTIFIC. El RNA se almacenó a -80°C tras la cuantificación.

### 5.4. PURIFICACIÓN DEL RNA Y TRATAMIENTO CON DNASAS

La purificación del RNA se llevó a cabo con el protocolo comercial **illustra™ RNAspin miniRNA Isolation Kit**. Este paso se realiza para eliminar el DNA presente tras la extracción.

Los tres tubos de RNA obtenidos en el protocolo anterior se unieron en un solo tubo: se tomaron 19 µl de cada uno, obteniéndose al final 57 µl de RNA. Tras la purificación, el RNA se eluyó en 40 µl de agua DEPC y se **cuantificó** en **NanoDrop**. También se conservó a -80°C.

### 5.5. SÍNTESIS DE cDNA MEDIANTE RT-PCR

Para la obtención de cDNA a partir del RNA extraído se usó el kit comercial de síntesis de cDNA de **qSCRIPT™**. Con este kit se obtiene cDNA mediante una RT-PCR de dos pasos.

La **RT-PCR** (Reverse Transcription PCR) es una variación de la PCR convencional en la que se obtienen multitud de copias de DNA complementario (cDNA) a partir de mRNA, usando una transcriptasa inversa o retrotranscriptasa y amplificando el producto de la retrotranscripción mediante PCR convencional. Una característica importante de este tipo de PCR es que el cDNA generado no lleva los intrones que tendría el DNA original, ya que el tratamiento con DNasas asegura la eliminación del posible DNA genómico contaminante del RNA total aislado <sup>[30]</sup>.

El protocolo seguido para la RT-PCR y los volúmenes añadidos para un volumen total de reacción de 20 µl quedan reflejados en la *Tabla 5.1* y la *Tabla 5.2*. La reacción se realizó con 1 µg de RNA. Tras realizarla, el cDNA sintetizado se almacenó a 4°C.

Temperatura	Tiempo
22°C	5 minutos
42°C	40 minutos
85°C	5 minutos

*Tabla 5.1: Ciclo térmico seguido en la RT-PCR.*

Reactivo	Volumen
RNA	1.24 µl
Agua DEPC	13.76 µl
qScript Reaction Mix (5X)	4 µl
qScript RT	1 µl
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>20 µL</b>

*Tabla 5.2: Volúmenes de los reactivos utilizados en la RT-PCR.*

## 5.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE cDNA MEDIANTE RT-qPCR

Una vez obtenido el cDNA a partir de las células embrionarias de lubina se llevó a cabo el análisis de su expresión en este tejido mediante una PCR cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR).

Una **PCR en tiempo real** o RT-qPCR es una variación de la PCR convencional (PCR a tiempo final), que se diferencia en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación. La detección de los productos amplificados ocurre en cada ciclo mediante el uso de marcadores fluorescentes que se incorporan al producto de PCR y, además, se cuantifica la cantidad de DNA en la muestra conforme va transcurriendo la reacción. Esto evita la necesidad de la comprobación posterior en geles de agarosa. La RT-qPCR se realiza en equipos que combinan los ciclos térmicos con capacidad de escaneado<sup>[30]</sup>. En este caso, el termociclador utilizado fue **MJ MiniTM Personal Thermal Cycler** y el lector de fluorescencia **Mini Opticon Real-Time PCR System**, ambos de Bio-Rad.

Se utilizó el kit **Sensimix Plus SYBR**, usando los primers diseñados en el anterior trabajo de investigación en el que se analizó la expresión de este gen (Tabla 5.3)<sup>[31]</sup>. Los primers tienen una concentración de 5 pmol/µl y las condiciones de la reacción fueron las reflejadas en la Tabla 5.4 y la Tabla 5.5.

Primer	Secuencia
Lipox Lu183CF (Fw)	5' GGATTCCTTTCCAACGCAGACACG 3'
Lipox R2 (Rv)	5' GCCACCATAGTAAACTGTCC 3'

*Tabla 5.3: Primers empleados en la RT-qPCR.*

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	10 minutos	
95°C	5 segundos	
63°C	3 segundos	x40
72°C	3 segundos	

*Tabla 5.4: Ciclo térmico seguido en la RT-qPCR.*

Reactivo	Muestra 1	Muestra 2	NTC
cDNA	4 µl*	4 µl**	- µl
MasterMix	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl
PF183	1.2 µl	1.2 µl	1.2 µl
PR2	1.2 µl	1.2 µl	1.2 µl
H <sub>2</sub> O	1.1 µl	1.1 µl	5.1 µl
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>15 µl</b>	<b>15 µl</b>	<b>15 µl</b>

*Tabla 5.5: Volúmenes de los reactivos utilizados en la RT-qPCR.*

\* El cDNA obtenido en el paso anterior.

\*\* cDNA obtenido por otro compañero de la misma forma.

## 5.7. OBTENCIÓN DEL cDNA DE LA ENZIMA MEDIANTE PCR

La **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos. Se aprovecha la actividad de la enzima DNA polimerasa (normalmente *Taq* polimerasa). En la reacción participan el molde de DNA, la enzima, los oligonucleótidos o primers, los dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato), Mg<sup>2+</sup>, un tampón o buffer (solución amortiguadora) y agua. Los dNTPs, el Mg<sup>2+</sup> y el tampón están incluidos en una única solución (*Master Mix*). Los primers deben diseñarse específicamente para el fragmento que se desea amplificar.

La PCR se divide en tres etapas que se repiten en cada ciclo: en la **desnaturalización** se separan las cadenas de DNA a una temperatura de 95°C; en la **hibridación** se alinean los primers con sus secuencias complementarias y se hibridan, dependiendo la temperatura de los cebadores; y, por último, en la **extensión**, la *Taq* polimerasa actúa elongando las cadenas completas de DNA a una temperatura de 72°C. La reacción se lleva a cabo en **termocicladores**, en concreto usando MJ Mini™ Personal Thermal Cycler como en el caso anterior [30].

En el presente trabajo se siguió el protocolo *MyTaq™ Red DNA Polymerase*, con una concentración de primers de 5 pmol/µl. Las condiciones seguidas, en general, son las expresadas en la *Tabla 5.6* y la *Tabla 5.7*.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	1 minuto	
95°C	15 segundos	x30-35*
58-62°C*	15 segundos	
72°C	10-20 segundos*	

*Tabla 5.6: Ciclo térmico general para las reacciones de PCR.*

\* Estas condiciones se variaron con el objetivo de optimizar el proceso.

Reactivo	Volumen
cDNA	x µl*
Primer Forward**	2 µl
Primer Reverse**	2 µl
Tx5 (MyTaq Red Reaction Buffer)	5 µl
Taq Polimerasa	0.5 µl
H <sub>2</sub> O	15.5-x µl
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>25 µl</b>

*Tabla 5.7: Volúmenes de reactivos empleados en las reacciones de PCR.*

\* La cantidad empleada de cDNA varía según la muestra empleada.

\*\* Los primers empleados se diseñan en este trabajo y varían según la PCR realizada.

Tras el proceso, los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa mediante **electroforesis**. Con ésta técnica se separan los fragmentos de DNA en función de su tamaño (que puede conocerse gracias al uso de **marcadores**) y después se visualizan mediante una tinción <sup>[32]</sup>.

En el presente trabajo se han preparado geles de agarosa al 0.8%, en tampón TBE 0.5x y con una concentración de bromuro de etidio (BrEt) de 1 µl/1 ml de gel. El tampón de carga usado ha sido 5x Green GoTaq® Flexi Buffer. Las muestras se prepararon según se indica en la *Tabla 5.8*. El marcador empleado en todas las electroforesis fue el de Dominion® que va de 100pb a 1.5kb.

Reactivo	Muestra	Marcador
Producto PCR	5 µl	-
Marcador	-	1 µl
Tampón de carga	2 µl	2 µl
H <sub>2</sub> O	3 µl	7 µl
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>

*Tabla 5.8: Volúmenes cargados en los geles de agarosa.*

## 5.8. AISLAMIENTO DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Se realiza con el objetivo de obtener un solo fragmento de DNA, identificado mediante la electroforesis. Se desarrolló el protocolo comercial *Isolate II PCR and Gel Kit*.

Una vez obtenido el cDNA purificado, se **cuantificó** mediante **NanoDrop** y se conservó a -20°C.

## 5.9. LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN

La **clonación mediante ligación y transformación** de bacterias competentes es un proceso que permite obtener múltiples copias de un fragmento de DNA. La ligación consiste en insertar el fragmento de DNA en un vector, en este caso un plásmido. Posteriormente, este plásmido se transfiere a las

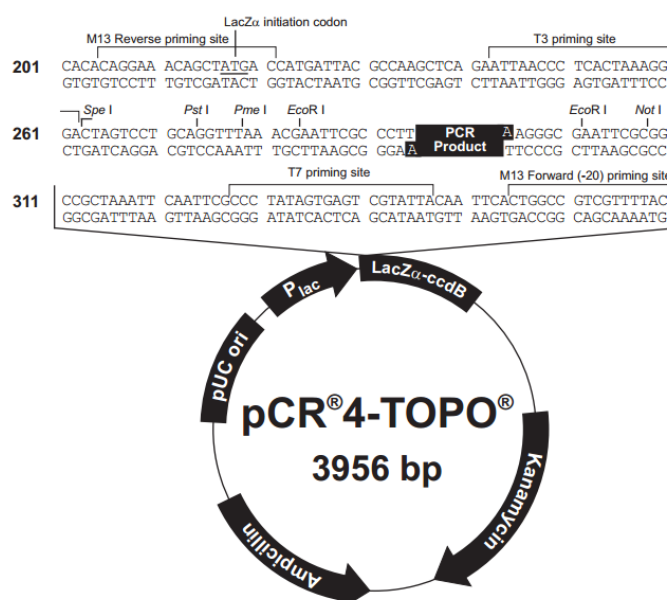


bacterias mediante la transformación y en ellas se obtienen múltiples copias de la secuencia. Los plásmidos se analizan tras estos pasos para comprobar si poseen el inserto.

Para la **ligación** se usó como vector de clonación el *plásmido pCR®4-TOPO®* (Figura 5.1) y se siguió el protocolo del kit *TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing*, de Invitrogen. Concretamente, se mezclaron los volúmenes de reacción señalados en la *Tabla 5.9*. La reacción se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Reactivo	Volumen
Producto PCR	4 µl
Solución Salina	1 µl
H <sub>2</sub> O	-
Vector TOPO	1 µl
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>6 µl</b>

*Tabla 5.9: Volúmenes de los reactivos en la reacción de ligación.*



*Figura 5.1: Mapa del vector de clonación pCR®4-TOPO®*

Debido a que el cDNA utilizado es un producto de PCR, sus extremos ya deben contener los nucleótidos de adenina terminales necesarios para que se produzca la ligación con este vector de expresión.

Sin embargo, al obtener resultados negativos en una primera ocasión, para la repetición del proceso se siguió el protocolo de **adición de A en el extremo 3'**. Se añadieron a las muestras Taq Polimerasa (0.5 µl) y Tx5 (4 µl) y se incubaron en el termociclador a 72°C durante 10 minutos.

Para la **transformación**, se siguió el protocolo *NEB 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency)*. Se añadieron 5 µl de la reacción de ligación y se modificó el final del protocolo: en un principio se añadieron 950 µl de medio SOC pero no se realizaron diluciones de los medios. Se centrifugó a 11000

g durante 1 minuto, se retiraron 700 µl del sobrenadante y se sembraron los 300 µl restantes en placas de medio LB-ampicilina, que se incubaron a 37°C toda la noche.

Tras dos intentos fallidos, se añadieron 550 µl en lugar de 950 µl y se omitieron las centrifugaciones. Se sembraron 300 µl en 2 placas. Todo el proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar: **SAFE 2020 de Thermo SCIENTIFIC.**

## 5.10. SELECCIÓN DE CLONES Y AISLAMIENTO DE LOS PLÁSMIDOS

Tras realizar la transformación del plásmido en las bacterias, solo crecerán aquellas que posean el plásmido dado que éste contiene un gen de resistencia a un antibiótico, en este caso la ampicilina. Para comprobar la presencia o no del inserto se realiza una **PCR a las colonias**.

Una vez incubadas las placas, se seleccionaron 10 colonias aleatoriamente y se picaron con la punta de una pipeta, depositándolas en un tubo Eppendorf con 25 µl de medio LB con ampicilina. Se dejaron crecer durante 2 horas aproximadamente a 37°C, en agitación.

Cuando el medio se volvió turbio, se tomaron 5 µl de cada Eppendorf y se pasaron a tubos de PCR de 0.2 ml, para después introducirlos en el termociclador durante 10 minutos a 98°C.

El producto de este proceso se tomó para realizar la PCR de las colonias con el objetivo de comprobar la presencia del inserto. Las condiciones de esta PCR quedan reflejadas en la *Tabla 5.10* y la *Tabla 5.11*.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	1 minuto	x35
95°C	15 segundos	
62°C	15 segundos	
72°C	20 segundos	

*Tabla 5.10: Ciclo térmico para la PCR de las colonias.*

Reactivo	Volumen
cDNA	5 µl
Primer Forward	2 µl
Primer Reverse	2 µl
Tx5 (MyTaq Red Reaction Buffer)	5 µl
Taq Polimerasa	0.25 µl
H <sub>2</sub> O	10.75 µl
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>25 µl</b>

*Tabla 5.11: Volúmenes de la reacción para la PCR de las colonias.*

Tras la PCR se realizó una **electroforesis** en gel de agarosa para evaluar los resultados. Tras obtener una banda a la altura esperada (700-800 pb), se prepararon 5.5 ml de medio LB ampicilina en tubos de

15 ml y se dejaron crecer las colonias que habían incorporado el inserto durante toda la noche a 37°C en agitación.

Una vez hecho esto, los plásmidos se aislaron mediante el kit **Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System – Quick Protocol**, según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se llevó a cabo la **cuantificación** del DNA purificado con **NanoDrop** y se conservó a -20°C.

Para comprobar que el aislamiento se ha realizado correctamente, se realizó una **PCR de los plásmidos aislados**. Esta PCR se llevó a cabo con el mismo ciclo térmico que la PCR de las colonias (*Tabla 5.10*) pero con nuevos volúmenes de reacción (*Tabla 5.12*), teniendo en cuenta la concentración obtenida de cDNA, del que se cargó 1 ng.

Al producto de esta PCR se le realizó una **electroforesis** en gel de agarosa junto con los plásmidos aislados para comprobar la presencia del inserto en los plásmidos.

Reactivo	Volumen
DNA molde (plásmido)	x µl
Primer Forward	2 µl
Primer Reverse	2 µl
Tx5 (MyTaq Red Reaction Buffer)	5 µl
Taq Polimerasa	0.25 µl
H <sub>2</sub> O	15 - x µl
VOLUMEN TOTAL	25 µl

*Tabla 5.12: Volúmenes de reacción para la PCR de los plásmidos purificados.*



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. BÚSQUEDA EN LAS BASES DE DATOS

La secuencia consenso de 1151 pb obtenida en la investigación anterior presenta mucha similitud al alinearla con varias secuencias de mRNA predichas como lipoxigenasa en varias especies de diferentes peces.

Dado que el nucleótido 674 no tiene asignada una base concreta y podría ser tanto C como T, se realizaron los alineamientos con ambas posibilidades. Los resultados indican que probablemente se corresponda con C porque los valores obtenidos son mejores que aquellos que resultan con T, pero, en cualquier caso, esto no supone ninguna diferencia respecto a los resultados obtenidos.

Los mejores valores de alineamientos de la secuencia se muestran en la *Figura 6.1*.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Lates calcarifer arachidonate 12-lipoxygenase, 12R-type-like (LOC108888239), mRNA</a>	1382	1382	99%	0.0	88%	<a href="#">XM_018684143.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Labrus bergylta hydroperoxide isomerase ALOXE3-like (LOC109994925), mRNA</a>	1312	1312	100%	0.0	87%	<a href="#">XM_020648436.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Labrus bergylta arachidonate 15-lipoxygenase B-like (LOC109976074), mRNA</a>	1258	1258	98%	0.0	87%	<a href="#">XM_020626284.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Larimichthys crocea arachidonate 15-lipoxygenase B-like (LOC104926982), mRNA</a>	1242	1242	97%	0.0	87%	<a href="#">XM_019255316.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Labrus bergylta arachidonate 15-lipoxygenase B-like (LOC109994929), mRNA</a>	1236	1236	98%	0.0	86%	<a href="#">XM_020648441.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Oreochromis niloticus arachidonate 12-lipoxygenase, 12R-type (LOC100706043), mRNA</a>	1232	1232	98%	0.0	86%	<a href="#">XM_019359968.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Oreochromis niloticus hydroperoxide isomerase ALOXE3 (LOC100706304), transcript variant X2, mRNA</a>	1199	1199	98%	0.0	86%	<a href="#">XM_019359972.1</a>

*Figura 6.1:* Secuencias de lipoxigenasa encontradas en la base de datos del NCBI que presentan mejores valores de alineamientos con el fragmento de 1151 pb.

Las secuencias de 12-Lipoxigenasa se obviaron. Se aprecia que la secuencia de 15-Lipoxigenasa que presenta mayor similitud es la de *Labrus bergylta*. Sin embargo, al realizar la selección del fragmento y compararlo con el genoma de *D. labrax* no se obtuvieron similitudes, por lo que se descartó.

Este proceso se repitió con las siguientes secuencias disponibles con el mismo resultado hasta llegar a la séptima posición, donde se encuentra la especie *Oreochromis niloticus*, que fue también la secuencia empleada en la investigación anterior para realizar todo este proceso y, además, está relacionada filogenéticamente con *D. labrax*<sup>[33]</sup>.

En el alineamiento con la secuencia de *O. niloticus* ([Anexo 1](#), [Anexo 2](#)), que se encuentra con el número de acceso XM\_019359972.1 en la base de datos del NCBI, puede localizarse fácilmente el supuesto ATG de la secuencia de lipoxigenasa.

Por ello, esta fue la secuencia seleccionada para realizar la búsqueda de la 15S-Lipoxigenasa en el genoma de la lubina.

Antes de continuar, se realizó la **comparación de las secuencias de aminoácidos** de los fragmentos de *O. niloticus* (O.NILOTICUS) y el obtenido en la investigación anterior (SEC.LIPOX):

SEC.LIPOX	1	-----	0
O.NILOTICUS	1	MVQYKVTVFTGDRLNSTTLNNVYIKLVGTDGESDRTWLMGLKGASSFVRG	50
SEC.LIPOX	1	-----	0
O.NILOTICUS	51	AVSKFKVSCSTSLGNLLLIELDKQSLPLFPEDDWFCAKVEVKSPEDIYN	100
SEC.LIPOX	1	-----	0
O.NILOTICUS	101	FPIYRWIADSKVHRFKDGKALKVFEDNHHLGGRYSRQQEIQQREEDYRWDT	150
SEC.LIPOX	1	-----	0
O.NILOTICUS	151	YAEGIPHSLSKAQNPIFLPSEVQFSFTKTTEFLYTASTGLTELKLGKLDNC	200
SEC.LIPOX	1	-----	0
O.NILOTICUS	201	KEKWDNIDGIDRVFCCKKTDISEYAQEHWKEDAFFGYQFLNGVNPILIQC	250
SEC.LIPOX	1	-----	0
O.NILOTICUS	251	CTTLPSNFPVTDMDVFPSSRCSLADEMKGNIFLCDYKLLDGVKANTING	300
SEC.LIPOX	1	-----MAPLVLLHKTPDDELMPAIAQLKQTPAEDNPIFFPTDSEYDWLTA	45
O.NILOTICUS	301	KKQYLMAPLVLLHKSPDNKLMPIAIAQLKQTPSDDNPIFLPTDSEYDWLIA	350
SEC.LIPOX	46	KIFVRSADFSEHQLNVHLLRTHLLAEVFAVSLLRNIPMVHPLYKLFIPHT	95
O.NILOTICUS	351	KIFVRSADFNHHQLNAHLLRTHLLAEVFAVSLLRNLPMVHPLYKLLKPHT	400
SEC.LIPOX	96	RYTLQINFLARLLLISKDGVFTQFAASGGEGMITILKRSLSMPTYSSLCM	145
O.NILOTICUS	401	RYTLQINFLARRLLISEIGFTQFAASGGEGMFTILKRSVSSMPTYSSLCI	450
SEC.LIPOX	146	PDDIAERGLECVPNFYKDDGLRLWDIIHRFVQGVLSYYYKTDAEVQQDS	195
O.NILOTICUS	451	TDDIAERGLEAVPNFYRDDGLKVDIIHRFVQGMGLGYKSDSEVQEDS	500
SEC.LIPOX	196	ELQKWILDIFEQGFLSNADTGIPQSFTTVAELIQFVTMAIFTSSAQHAAV	245
O.NILOTICUS	501	ELQKWIMDIFEHGFFSQAETGIPQFTFCVTELVKFVTMVIFTCSAQHAAV	550
SEC.LIPOX	246	NSGQFDYGGWMPNTPISLQRPPTTKGTTSEATMLQTFPAVNNTTVQGMAT	295
O.NILOTICUS	551	NSGQYDYGGWMPNTPISLQLPPTTKGTTSEATMLATFPDVNNTTVQGMAT	600
SEC.LIPOX	296	MWLLSRQSSDFVPLGHYPEDHFNEEIPCKLVKDFQGELKVLSEAIKVRNK	345
O.NILOTICUS	601	MWLLSKQSSDFVPLGQYPEEHFTEEIPRKILKDFQMELEDLSLVIKGRNK	650
SEC.LIPOX	346	SLEVPYTYMDPTEVENSVAI	365
O.NILOTICUS	651	RLEVPYTYMDPAELENVAI	670

Como se puede observar, las secuencias resultaron ser muy parecidas en la zona comparada, por lo que podría suponerse que también se parecerán en gran medida en la zona no caracterizada.

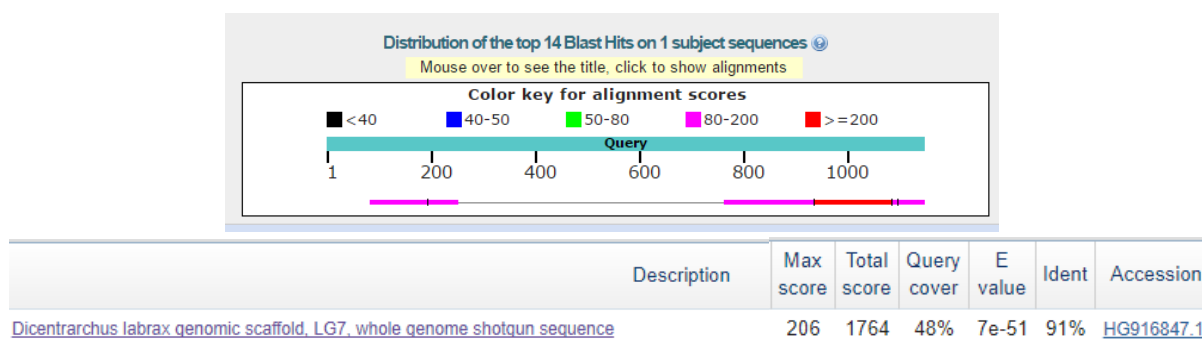
Se seleccionó un **pequeño fragmento** dentro de la secuencia de *O. niloticus*, que va desde el principio de la secuencia hasta un poco después de la zona ya secuenciada en la investigación anterior:

```

1  CTTGAAGATT TGAGTTTAGT CATCAGAGCC AGAAACAAGC GTTTAGAAGT GCCATACACC
61 TACATGGATC CAGCACAGGA TTTCAAGAGG AAAAATGGTG CAGTATAAAG TGACCGTATT
121 CACTGGTGAT CGCCTTAATT CCACTACTCT TAACAATGTC TACATTAAGC TGGTGGGCAC
181 AGATGGGGAG AGTGATCGCA CGTGGCTCAT GGGCTTGAAA GGGGCTTCAT CCTTCGTCAG
241 AGGAGCCGTA TCAAAGTTTA AGGTGTCCTG CTCCACTTCC CTTGGAAATC TTCTACTAAT
301 AGAGTTAGAC AAACAGTCTC TCCCCTGTT CCCAGAGGAT GATTGGTTTT GTGCCAAGGT
361 GGAAGTGAAA TCCCCTGAAG GAGACATCTA CAATTTTCCC ATCTACCGCT GGATTGCTGA
421 TAGCAAGGTG CACCGCTTTA AAGATGGAAA AGCTCTGAAA GTCTTTGAAG ACAACCATCA
481 TCTTGGCAGG TACAGTCGGC AGCAGGAGAT TCAGCAGCGA GAGGAAGACT ATCGCTGGGA
541 TACATATGCA GAGGGAATAC CTCACTCCTT GAAGGCACAA AACCCAATTT TTCTGCCATC
601 TGAGGTTTCA TTCTCCTTCA CCAAACTAC AGAGTTTCTC TACACTGCTT CCACAGGACT
661 GACTGAGCTG AAGCTGAAGG GACTGGATAA CTGTAAGGAG AAGTGGGATA ATATTGACGG
721 CATCGATCGA GTGTTTTGCT GCAAAAAGAC TGACATATCA GAATATGCTC AGGAACACTG
781 GAAAGAGGAT GCTTTCTTTG GCTACCAGTT TCTAAATGGT GTCAACCCCA TTTTGATCCA
841 GTGTTGTACA ACCCTGCCCC GTAACCTCCC TGTCACTGAT GACATGGTCT TTCCCCGCAG
901 TCGTTGCAGC CTTGCAGATG AAATGAAGAA AGGGAACATA TTCTGTGTG ACTACAACT
961 TCTGGATGGG GTGAAAGCAA ACACCATCAA TGGGAAGAAG CAGTACTTGA TGGCTCCTCT
1021 CGTCCTGCTC CACAAATCTC CTGACAATAA ACTAATGCCG ATTGCTATTC AGCTGAAGCA
1081 GACTCCATCA GATGACAATC CAATCTTTCT TCCTACTGAT TCTGAGTACG ACTGGTTGAT

```

Con este fragmento se realizó la **comparación en BLAST** con el genoma de la lubina. Los resultados se observan en la *Figura 6.2*.



**Figura 6.2:** Resultados del alineamiento de la secuencia de lipoxigenasa de *O. niloticus* con el genoma de *D. labrax*.

Solo se encontró similitud con un fragmento del genoma, el contig LG7, lo que facilitó enormemente la búsqueda. Los distintos alineamientos que se obtuvieron como resultado se ordenaron en función a la secuencia normal del mRNA, comparándose entre ellos mediante herramientas informáticas.

Una vez ordenadas las secuencias ([Anexo 3](#)) se seleccionaron únicamente los fragmentos iniciales ([Anexo 4](#)), que contienen el supuesto ATG, para compararlos entre ellos ([Anexo 5](#)). Esto se realizó porque se encontraron dos secuencias muy parecidas en las que se podrían diseñar los primers.

Al comprobar que ambas secuencias podían usarse por su gran parecido, se pasó al diseño de primers.

## 6.2. DISEÑO DE PRIMERS

Se seleccionó la secuencia de *D. labrax* ([Anexo 6](#)) y se diseñaron **dos primers forward** en esa zona. Posteriormente, se diseñaron **dos primers reverse** específicos en la zona del principio de la secuencia obtenida en la investigación anterior.

Los primers diseñados ([Anexo 7](#)) quedan reflejados en la *Tabla 6.1*. El uso de estos primers debería amplificar un producto de PCR de un tamaño estimado de 700-800 pb aproximadamente, aunque si la comparación se realiza con el cDNA de otras especies el producto esperado podría tener entre 500 y 1200 pb.

Primer	Secuencia
F11 (Fw)	5'-TTCCAGAGTGAAAATGGTGGATT-3'
F212 (Fw)	5'-AAATGGTGGATTATGAAGTGAGC-3'
R1154 (Rv)	5'-CCATCAAGTACTGCTTCTTTCC-3'
R2176 (Rv)	5'-TTGTGGAGCAGGACGAGAGG-3'

*Tabla 6.1: Primers específicos diseñados.*



*Figura 6.3: Esquema de los primers diseñados. La zona punteada (izquierda) representa la secuencia de *D. labrax* obtenida en este trabajo, donde se supone que está el ATG. La zona blanca (derecha) representa la secuencia obtenida en la investigación anterior.*

## 6.3. EXTRACCIÓN DE RNA

Los resultados de la cuantificación tras la extracción de RNA se recogen en la *Tabla 6.2*.

Tubo	Concentración (ng/μl)	Relación 260/280
1	675.1	2.02
2	662	2.04
3	416.2	2.07

*Tabla 6.2: Resultados de la cuantificación de RNA.*

## 6.4. PURIFICACIÓN DEL RNA Y TRATAMIENTO CON DNASAS

Tras la purificación, la muestra de RNA purificado se cuantificó y se obtuvo:

- **Concentración:** 805.4 ng/μl.
- **Relación 260/280:** 2.14.



6.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE cDNA MEDIANTE RT-qPCR

Los resultados obtenidos en la RT-qPCR pueden observarse en la *Figura 6.4* y la *Figura 6.5*.

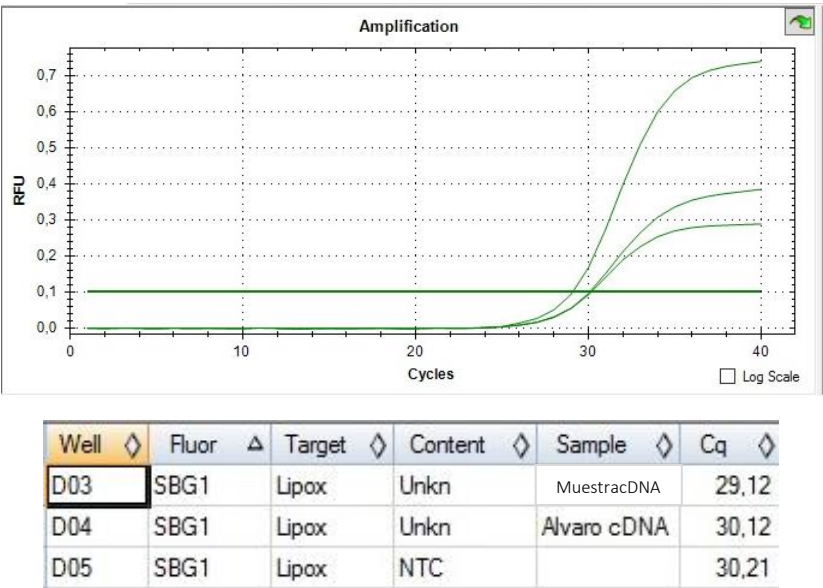


Figura 6.4: Curvas de amplificación con sus datos de  $C_T$  de la RT-qPCR.

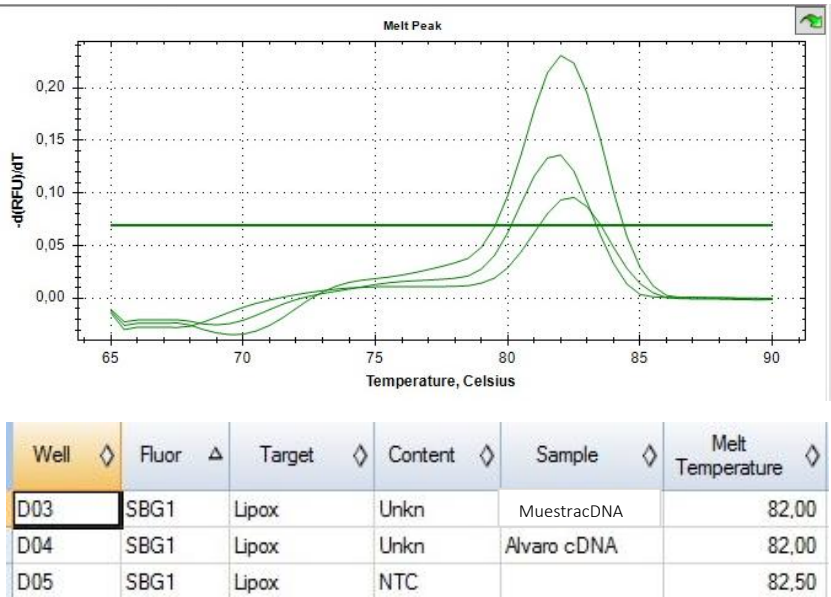


Figura 6.5: Curvas de picos de Melting con los datos de temperatura de Melting de la RT-qPCR.

El **valor de  $C_T$**  representa el número de ciclos de amplificación necesarios en la PCR para generar una señal fluorescente detectable. Dado que el único objetivo de esta RT-qPCR es comprobar si se expresa suficiente cantidad de cDNA en las muestras, no es necesario calcular la concentración de las mismas.

Analizando los resultados obtenidos en la investigación de la que se tomaron las condiciones de RT-qPCR <sup>[31]</sup>, se comprobó que **la expresión era adecuada** para los procesos que se llevarían a cabo a

continuación. En cuanto a la  $C_T$  obtenida en el control negativo (NTC), se debe a posibles contaminaciones o a la amplificación de pequeños productos inespecíficos.

Respecto a la **temperatura de melting**, puede observarse que coincide en el caso de las muestras y es diferente en el NTC, lo que confirma que se debe a la amplificación de otros productos inespecíficos diferentes a la muestra. Con estos resultados se decidió seguir adelante y comenzar con la amplificación de la secuencia de interés.

## 6.6. OBTENCIÓN DEL cDNA DE LA ENZIMA

Se realizaron **4 reacciones de PCR** en las que se fueron optimizando las condiciones hasta conseguir amplificar el fragmento deseado. Se variaron los ciclos térmicos y los primers empleados, teniendo en cuenta la temperatura de melting de los primers seleccionados y otros factores como el tamaño del producto de PCR que se espera obtener, que determina el tiempo de elongación o extensión.

Para obtener las condiciones ideales se realizaron reacciones de PCR anidadas, en las que el molde de DNA consistía en muestras que ya habían pasado por reacciones de amplificación. Una vez obtenidas las condiciones aptas, se pasó a usar como molde cDNA puro y el resultado de esta PCR, la cuarta realizada, fue el empleado para el siguiente paso.

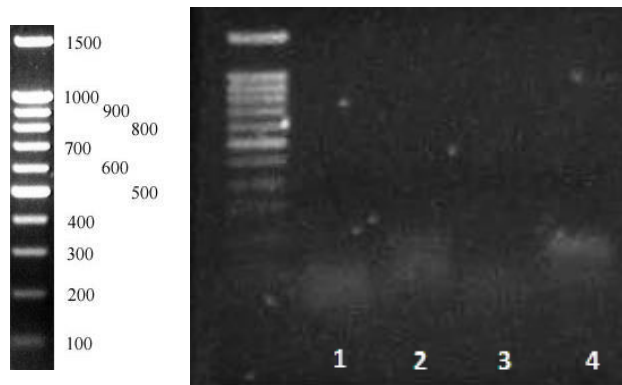
### 6.6.1. PCR 1

En primer lugar, se realizó una PCR de prueba, con el objetivo de ir comprobando cómo afectan las condiciones a los primers diseñados.

Para la **PCR 1** el ciclo térmico empleado tuvo una temperatura de hibridación de 58°C, 10 segundos de extensión y 30 ciclos de amplificación. Las reacciones preparadas pueden observarse en la *Tabla 6.3* y los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de los productos pueden observarse en la *Figura 6.6*.

Tubo	Pareja de primers	Muestra de cDNA
1	F11 – R2176	4 µl cDNA original
2	F212 – R1154	4 µl cDNA original
3 (NTC)	F11 – R2176	-
4 (NTC)	F212 – R1154	-

*Tabla 6.3: Reacciones preparadas para la PCR 1.*



*Figura 6.6: Resultados de la electroforesis de los productos de la PCR 1.*

No se aprecian bandas con el tamaño esperado, por lo que concluimos que las condiciones no eran las óptimas para los primers y se realizó otra PCR variando las condiciones de reacción. Dado que los controles negativos (tubos 3 y 4) no presentaron resultados, quedó comprobado que no se producían amplificaciones inespecíficas por lo que no se volvieron a realizar NTC en las posteriores reacciones.

### 6.6.2. PCR 2

Para la **PCR 2** se prepararon las reacciones indicadas en la *Tabla 6.4*. En los tubos 7, 8 y 9 se realizaron reacciones de PCR anidadas, esperando obtenerse así mejores resultados. El ciclo térmico usado fue el mismo que el de la PCR 1. Los resultados pueden verse en la *Figura 6.7*.

Tubo	Pareja de primers	Muestra de cDNA
5	F11 – R2176	10 µl cDNA original
6	F212 – R1154	10 µl cDNA original
7	F212 – R1154	5 µl tubo 1 (PCR 1)
8	F11 – R1154	5 µl tubo 1 (PCR 1)
9	F212 – R2176	5 µl tubo 1 (PCR 1)

*Tabla 6.4: Reacciones preparadas para la PCR 2.*



*Figura 6.7: Resultados de la electroforesis de los productos de la PCR 2.*

Puede observarse que en el **tubo 9** apareció una banda del tamaño esperado: 700-800 pb. También apareció una banda de 1200 pb, aproximadamente, que se estudiará en la posterior PCR.

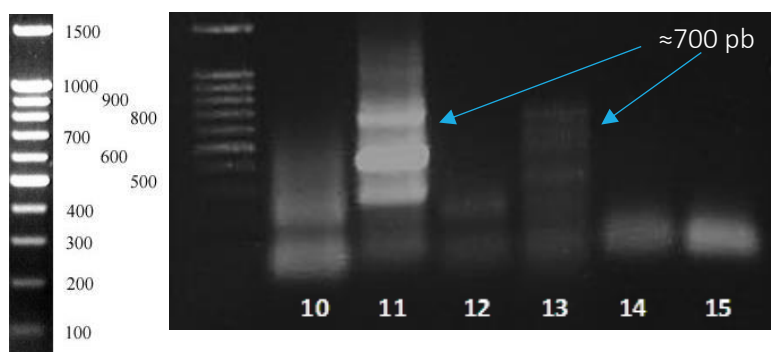
Las bandas del tubo 9 se recortaron y purificaron mediante el protocolo mencionado en el *Apartado 5.8*. Sin embargo, al aparecer solo bandas en el tubo 9, se intentó optimizar el proceso realizando una nueva PCR con otras condiciones. En esta PCR se incluyeron dos reacciones con el producto del tubo 9 purificado para comprobar los resultados.

### 6.6.3. PCR 3

Dados los resultados obtenidos, se preparó la **PCR 3**, con las reacciones que aparecen en la *Tabla 6.5*. Se probó sobre todo con el primer F212 porque fue el que generó buenos resultados en el tubo 9 en la PCR 2. Además, se probaron nuevas condiciones: se aumentó el tiempo de extensión a 20 segundos y la temperatura de hibridación a 60°C. Los resultados pueden verse en la *Figura 6.8*.

Tubo	Pareja de primers	Muestra de cDNA
10	F212 – R1154	5 µl tubo 8 (PCR 2)
11	F212 – R1154	5 µl tubo 9 (PCR 2)
12	F11 – R1154	5 µl tubo 5 (PCR 2)
13	F212 – R2176	5 µl tubo 5 (PCR 2)
14	F212 – R1154	5 µl banda 700-800pb
15	F212 – R1154	5 µl banda 1200pb

*Tabla 6.5: Reacciones preparadas para la PCR 3.*



*Figura 6.8: Resultados de la electroforesis de los productos de la PCR 3.*

Se observan resultados positivos, es decir, presencia de la banda a la altura esperada (700 pb), en los **tubos 11 y 13**. La mayor intensidad obtenida en el tubo 11 podría explicarse porque el molde ya había pasado por dos reacciones de amplificación, mientras que el molde del tubo 13 solo había pasado por una reacción.

Se aprecia que no se obtienen resultados a partir de las muestras purificadas del gel anterior (tubos 14 y 15), probablemente por un mal aislamiento de las mismas ya que en el tubo 11 la muestra provenía del tubo 9 y los resultados son positivos.

Una vez obtenida claramente la banda deseada aunque con poca intensidad, el objetivo fue obtener el mismo resultado a partir de una muestra de cDNA puro, porque las utilizadas hasta ahora provenían de otras amplificaciones. Para ello, se repitió la PCR con una de las parejas de primers que funcionó para asegurar los resultados (F212 y R2176) y con cambios en el ciclo térmico, intentando optimizar el proceso.

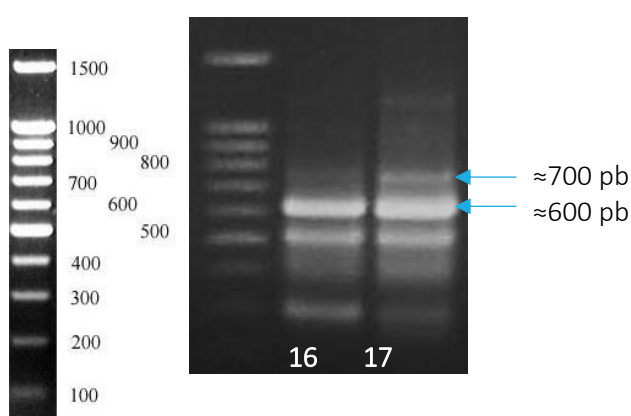
#### 6.6.4. PCR 4

Así, se realizó la **PCR 4** con las reacciones indicadas en la *Tabla 6.6*. Para el tubo 16 se tomaron 0.5  $\mu$ l de una muestra de cDNA de una investigación anterior<sup>[31]</sup>, de branquia de un individuo (individuo 4), debido a que demostró una gran expresión de cDNA.

La temperatura de hibridación se aumentó a 62°C y el número de ciclos de amplificación pasó a ser 35. Los resultados se observan en la *Figura 6.9*.

Tubo	Pareja de primers	Muestra de cDNA
16	F212 – R2176	0.5 $\mu$ l cDNA Individuo 4
17	F212 – R2176	0.5 $\mu$ l tubo 9 (PCR 2)

*Tabla 6.6: Reacciones preparadas para la PCR 4.*



*Figura 6.9: Resultados de la electroforesis de los productos de la PCR 4.*

Con estas condiciones se aprecia claramente la presencia de la banda de aproximadamente 700 pb y otra de 600 pb, por lo que podemos concluir que las condiciones son las adecuadas.

Tras este proceso, se realizó el **aislamiento de la banda deseada**, de 700 pb del tubo 16 (el que contiene la banda obtenida a partir de la muestra de cDNA sin amplificar), siguiendo el protocolo especificado anteriormente en este trabajo en el *Apartado 5.8*. No se escoge el tubo 17 al haber pasado ya por tres reacciones de amplificación.

Para el aislamiento, se cargó en un gel todo el producto de PCR del tubo 16. Posteriormente, el resultado del aislamiento se cuantificó en NanoDrop y se obtuvo:

- **Concentración:** 31.3 ng/μl.
- **Relación 260/280:** 1.62.

## 6.7. LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN

Se realizó la **ligación** y la **transformación** de las células competentes siguiendo el protocolo indicado anteriormente (*Apartado 5.9*). Sin embargo, no creció ninguna colonia en las placas de medio LB con ampicilina tras la incubación a 37°C durante toda la noche.

Se repitió el proceso volviendo a realizar el aislamiento de las bandas obtenidas en las anteriores reacciones de PCR para obtener una mayor concentración. Para ello, se llevó a cabo una electroforesis con aquellos productos de PCR en los que se había observado la presencia de la banda de 700 pb: el tubo 9 (PCR2), el tubo 11 (PCR 3) y el tubo 17 (PCR 4). El aislamiento se hizo a partir de este gel.

Al cuantificar, se obtuvo:

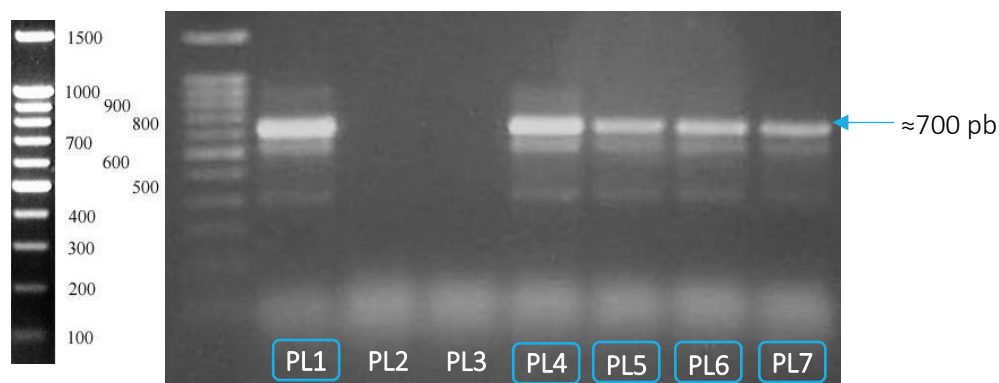
- **Concentración:** 25.1 ng/μl.
- **Relación 260/280:** 1.82.

Con el producto de este segundo aislamiento se volvió a realizar el protocolo de ligación y transformación, pero antes se llevó a cabo la **adición de adeninas terminales en el extremo 3'** siguiendo el protocolo ya mencionado anteriormente (*Apartado 5.9*).

Tampoco crecieron las colonias en esta ocasión, por lo que se decidió repetir el protocolo de ligación y transformación con algunos cambios, a partir del cDNA con las adeninas terminales ya añadidas. El cambio que se realizó fue añadir 550 μl de medio y no realizar las centrifugaciones, como se ha mencionado en el *Apartado 5.9*. Con este cambio en el proceso, crecieron bacterias en las placas y se pudo continuar. Esto podría significar que las bacterias no toleran la centrifugación a la que se les sometió.

## 6.8. SELECCIÓN DE CLONES Y AISLAMIENTO DE LOS PLÁSMIDOS

Se siguió el protocolo indicado y se preparó una **PCR de las colonias** con los primers F212 y R2176, para comprobar la presencia del inserto. El resultado de la electroforesis de los productos de esta PCR queda reflejado en la *Figura 6.10*.



*Figura 6.10: Resultados de la PCR de las colonias.*

Se observa la presencia del inserto en 5 de las colonias crecidas. Estas se seleccionaron y se dejaron crecer toda la noche. Dos de las colonias aisladas (PL4 y PL5) no crecieron y en las otras tres, PL1, PL6 y PL7, se observó poco crecimiento, pero de igual forma se realizó el protocolo de aislamiento de DNA mencionado.

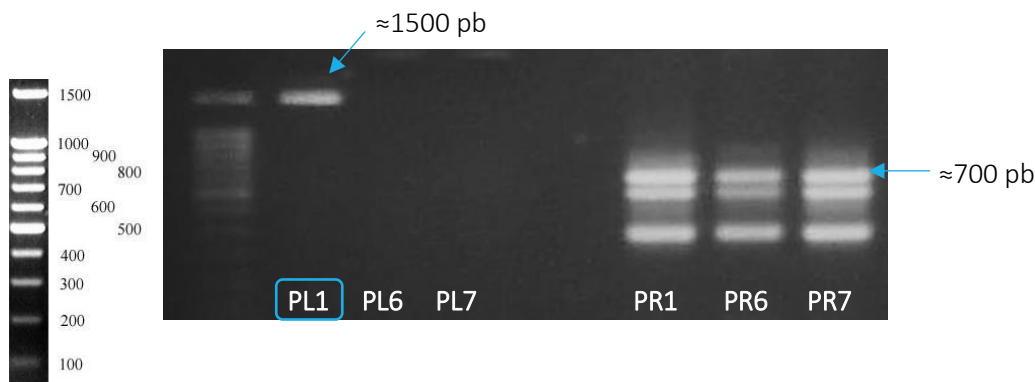
El resultado de la cuantificación, que se encuentra en la *Tabla 6.7*, no fue satisfactorio por la poca concentración de DNA obtenida, muy probablemente debido al bajo crecimiento de las bacterias. También es destacable la relación 260/280 de PL6, muy alejada del valor óptimo.

Plásmido	Concentración	Relación 260/280
PL1	10.6 ng/μl	1.56
PL6	0.1 ng/μl	0.11
PL7	1.1 ng/μl	1.46

*Tabla 6.7: Resultados de la cuantificación de los primeros plásmidos aislados.*

Aún con los resultados obtenidos se realizó una **PCR de los plásmidos aislados**. El producto de esta PCR (PR1, PR6, PR7) se cargó en un gel de agarosa junto con los plásmidos aislados y el resultado puede verse en la *Figura 6.11*. Se aprecia que, debido a la baja concentración de los plásmidos, solo se obtuvieron resultados positivos con PL1, a una altura aproximada de 1500 pb.

Por otro lado, se observan buenos resultados de la PCR de las colonias, ya que aparece el inserto (700 pb) claramente en todos los casos.



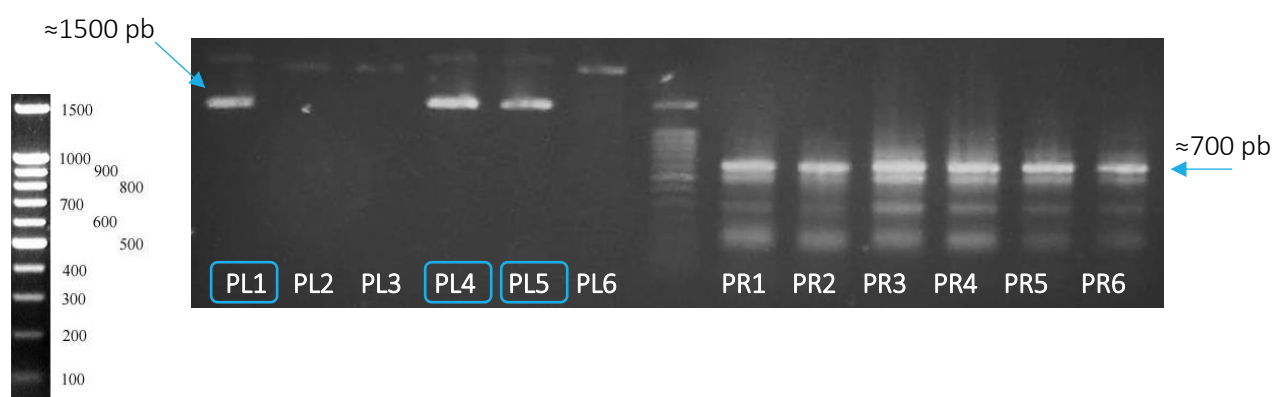
*Figura 6.11: Resultados de la electroforesis de los primeros plásmidos aislados y de los productos de PCR de los mismos.*

Dado que con esta concentración de plásmidos no es conveniente llevar a cabo la secuenciación, se repitió el protocolo. Se dejaron crecer las bacterias en la placa durante 1 día más y se volvieron a picar, creciendo seis de ellas (PL1, PL2, PL3, PL4, PL5 y PL6). Esta vez sin comprobar la presencia del inserto, se realizó el protocolo de aislamiento de DNA y se cuantificaron los resultados en NanoDrop (*Tabla 6.8*).

Después, se realizó la **PCR de los plásmidos aislados** y el producto se corrió en un gel, junto con los plásmidos aislados (*Figura 6.12*).

Plásmidos	Concentración	Relación 260/280
PL1	22.5 ng/μl	1.89
PL2	9.9 ng/μl	1.85
PL3	9.4 ng/μl	1.60
PL4	24.5 ng/μl	1.87
PL5	21.8 ng/μl	1.83
PL6	11.9 ng/μl	1.75

*Tabla 6.8: Resultados de la cuantificación de los segundos plásmidos aislados.*



*Figura 6.12: Resultado de la electroforesis de los segundos plásmidos aislados y los productos de PCR de los mismos.*

Se observan claramente los plásmidos con mayor concentración (PL1, PL4 Y PL5), ya que la cantidad cargada de cada uno no fue la misma y lo lógico es que se aprecien con mayor intensidad. El resto de plásmidos (PL2, PL3 Y PL6) apenas se aprecian debido a su baja concentración y, además, tienen tamaños diferentes. Esto se explicaría por el estado de los plásmidos, ya que la movilidad depende de su conformación (pueden estar superenrollados, en forma lineal...).

En cuanto a los productos de PCR, el resultado vuelve a ser satisfactorio porque se observa el inserto en todas las colonias aisladas: todos los plásmidos contenían el inserto adecuado. Sin embargo, dados los resultados, se obvian PL2, PL3 y PL6 por presentar tamaños mayores al resto de los plásmidos.

El siguiente paso sería la secuenciación de los plásmidos PL1, PL4 y PL5.



## 7. CONCLUSIONES

- Se han encontrado en el genoma de la lubina (*D. labrax*) distintas entradas con información sobre la secuencia del extremo 5' del gen de una posible 15S-Lipoxigenasa.
- Se ha llevado a cabo el diseño de primers específicos para amplificar el extremo 5' del gen de la 15S-Lipoxigenasa de lubina.
- Se ha optimizado la reacción de amplificación de PCR con una pareja de primers y se ha obtenido un fragmento de cDNA cuyo tamaño se corresponde con el esperado.
- Se han obtenido tres clones con plásmidos que contienen el inserto del tamaño adecuado.



## 8. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Después de clonar el fragmento, deberían seguirse los pasos llevados a cabo en investigaciones similares, como las realizadas por el grupo de investigación.

El siguiente paso en este proceso sería llevar a cabo la reacción de secuenciación del fragmento obtenido mediante analizadores genéticos. Después de la lectura deben solucionarse las indeterminaciones y se debe realizar la limpieza de las secuencias obtenidas, usando herramientas informáticas como Bioedit.

Hecho esto, se pasaría a obtener el cDNA completo de la 15S-Lipoxigenasa mediante el uso de los primers diseñados en el presente trabajo y los diseñados en otros proyectos del grupo de investigación. Se realizaría el clonaje y la secuenciación del fragmento obtenido.

Con la secuencia de la proteína completa, podría llevarse a cabo su caracterización bioinformática. Se podrían buscar diversos datos de interés como motivos conservados, la familia proteica a la que pertenece, características de la proteína... Esto se haría con herramientas como las usadas en investigaciones similares:

- El software BioAnnotator: aporta datos importantes de la proteína como el peso molecular, el punto isoeléctrico y el coeficiente de extinción molar.
- NCBI Conserved Domain: herramienta del NCBI que analiza los dominios conservados.
- ScanProsite: muestra los dominios de las proteínas.
- SWISS-MODEL: herramienta de Expasy que permite obtener modelados de la estructura de la proteína deducida.

Por otro lado, sería interesante también realizar la caracterización funcional del cDNA mediante su expresión heteróloga en bacterias. Esto se realizaría introduciendo el cDNA de la 15S-Lipoxigenasa en vectores de expresión, de forma que se produjera en bacterias como *E. coli* y pudieran estudiarse sus efectos gracias a la posterior purificación de las proteínas expresadas mediante distintos procesos (cromatografía, por ejemplo).

Además, conocida ya la secuencia de la proteína, podrían realizarse estudios de expresión en la lubina, que aportarían más información sobre su papel en el organismo. Por ejemplo, podría estudiarse su expresión en función de la alimentación, de forma que se avanzara en el campo de la acuicultura.



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2005). *Lipid biosynthesis. Principles of Biochemistry*. New York: WH Freeman and Company, 787-815.
- [2] González-Rovira, A. (2012). *Estudio molecular del metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados de la lubina (Dicentrarchus labrax)* (tesis doctoral). Universidad de Cádiz, España.
- [3] Tvrzicka, E., Kremmyda, L. S., Stankova, B., y Ales, Z. (2011). Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease—a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers*, 155(2), 117-130.
- [4] CBN, I. I. (1977). The Nomenclature of Lipids. Recommendations, 1976. *Eur J Biochem*, 79, 11-21.
- [5] Wakil, S. J., Stoops, J. K., y Joshi, V. C. (1983). Fatty acid synthesis and its regulation. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 537-579.
- [6] Burdge, G. C. (2010). Polyunsaturated fatty acid intakes and linolenic acid metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(3), 665-666.
- [7] Das, U. N. (2006). Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology journal*, 1(4), 420-439.
- [8] Harizi, H., Corcuff, J. B., y Gualde, N. (2008). Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in molecular medicine*, 14(10), 461-469.
- [9] Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., y Phipps, R. P. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in immunology*, 23(3), 144-150.
- [10] Wada, M., DeLong, C. J., Hong, Y. H., Rieke, C. J., Song, I., Sidhu, R. S., ... y Smyth, E. M. (2007). Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22254-22266.
- [11] Levin, G., Duffin, K. L., Obukowicz, M. G., Hummert, S. L., Fujiwara, H., Needleman, P., y Amiram, R. A. Z. (2002). Differential metabolism of dihomo- $\gamma$ -linolenic acid and arachidonic acid by cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2: implications for cellular synthesis of prostaglandin E1 and prostaglandin E2. *Biochemical Journal*, 365(2), 489-496.
- [12] Sargent, J. R., Tocher, D. R., y Bell, J. G. (2002). The lipids. *Fish nutrition*, 3, 181-257.
- [13] Simopoulos, A. P. (2000). Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry science*, 79(7), 961-970.

- [14] Tidwell, J. H., y Allan, G. L. (2001). Fish as food: aquaculture's contribution. *EMBO reports*, 2(11), 958-963.
- [15] APROMAR, Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos. (2016). *Informe sobre La Acuicultura Marina de Peces en España 2016*. Recuperado de <http://www.apromar.es/>
- [16] Owen, J. M., Adron, J. W., Middleton, C., y Cowey, C. B. (1975). Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot *Scophthalmus maximus* L., and rainbow trout, *Salmo gairdnerii* rich. *Lipids*, 10(9), 528-531.
- [17] Ghioni, C., Tocher, D. R., Bell, M. V., Dick, J. R., y Sargent, J. R. (1999). Low C 18 to C 20 fatty acid elongase activity and limited conversion of stearidonic acid, 18: 4 (n-3), to eicosapentaenoic acid, 20: 5 (n-3), in a cell line from the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1437(2), 170-181.
- [18] Tocher, D.R. y Ghioni, C. (1999). Fatty acid metabolism in marine fish: low activity of fatty acyl D5 desaturation in gilthead Sea bream (*Sparus aurata*) cells. *Lipids*, 34(5), 433-440.
- [19] Tocher, D.R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(2), 107-184.
- [20] Sargent, J.R. y Tacon, A.G.J. (1999). Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(2), 377-383.
- [21] Sargent, J.R., Henderson, R.J. y Tocher, D.R. (1989). The lipids. *Fish Nutrition*, 2, 153-218.
- [22] Sargent, J. R., Henderson, R. J., y Hamilton, R. (1995). Developments in oils and fats. *Developments in oils and fats*.
- [23] Rowley, A. F., Kühn, H., y Schewe, T. (Eds.). (2015). *Eicosanoids and related compounds in plants and animals*. Princeton University Press.
- [24] Feussner, I., y Kühn, H. (2000). Application of lipoxygenases and related enzymes for the preparation of oxygenated lipids. *Enzymes in Lipid Modification*, 307-336.
- [25] Kuhn, H., y Thiele, B. J. (1999). The diversity of the lipoxygenase family. *FEBS letters*, 449(1), 7-11.
- [26] Boyington, J., Gaffney, B., y Amzel, L. (1993). The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science*, 260(5113), 1482-1486.
- [27] Newcomer, M. E., y Brash, A. R. (2015). The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis. *Protein Science*, 24(3), 298-309.

- [28] Cathaysa, A. (2016). *Clonación y caracterización molecular del ADNc de la enzima 15S-Lipoxigenasa (EC1.13.11.33) de lubina (Dicentrarchus labrax)* (trabajo de fin de grado). Universidad de Cádiz, España.
- [29] Chuang, L. Y., Cheng, Y. H., y Yang, C. H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology letters*, 35(10), 1541-1549.
- [30] Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- [31] López-Martín, C. (2015). *Análisis del perfil de expresión en tejidos de la 15S-Lipoxigenasa (EC1.13.11.33) de la lubina (Dicentrarchus labrax)* (trabajo de fin de grado). Universidad de Cádiz, España.
- [32] Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 27.
- [33] Tine, M., Kuhl, H., Gagnaire, P. A., Louro, B., Desmarais, E., Martins, R. S., ... y Dieterich, R. (2014). European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nature communications*, 5, 5770.





## ABREVIATURAS

**AA** – Ácido araquidónico.

**BLAST** – Basic Local Alignment Search Tool.

**BrEt** – Bromuro de etidio.

**cDNA** – DNA complementario al mRNA.

**DEPC** – Pirocarbonato de dietilo (diethyl pyrocarbonate).

**DHA** – Ácido docosahexaenoico.

**dNTPs** – Desoxirribonucleótidos trifosfato.

***E. coli*** – *Escherichia coli*.

**EDTA** – Ácido etilendiaminotetraacético

**EPA** – Ácido eicosapentaenoico.

**FAS** – Ácido graso sintasa (Fatty Acid Synthase).

**HUFAs** – Ácidos grasos altamente insaturados (Highly Unsaturated Fatty Acids).

**LA** – Ácido linoleico.

**LCFA** – Ácidos grasos saturados de cadena larga (Long Chain Fatty Acids).

**LNA** – Ácido linolénico.

**LOX** – Lipoxigenasa.

**LTs** – Leucotrienos.

**MCFA** – Ácidos grasos saturados de cadena media (Medium Chain Fatty Acids).

**mRNA** – RNA mensajero.

**NCBI** – National Center of Biotechnology Information.

**NTC** – Control negativo (No Template Control).

**PLAT** – Polycystin-1, Lipoxigenasa, Alfa-Toxina.

**PCR** – Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

**PGs** – Prostaglandinas.

**PUFAs** – Ácidos grasos poliinsaturados (Poly Unsaturated Fatty Acids).

**RT-PCR** – PCR de transcripción inversa (Reverse Transcription PCR).

**RT-qPCR** – PCR cuantitativa en Tiempo Real.

**SCFA** – Ácidos grasos saturados de cadena corta (Short Chain Fatty Acids).

**TBE** – Disolución tamponadora de TRIS, borato y EDTA.

**TXAs** – Tromboxanos.

**Tx5** – Tampón x5.

## ANEXOS

### ANEXO 1

>Predicted *Oreochromis niloticus* hydroperoxide isomerase ALOXE3, transcript variant X2, mRNA

```
CTTGAAGATTTGAGTTTAGTCATCAGAGCCAGAAACAAGCGTTTAGAAGTGCCATACACCTACATGGATCCAGCA
CAGGATTTCAAGAGGAAAAATGGTGCAGTATAAAGTGACCGTATTCACTGGTGATCGCCTTAATTCCACTACTCT
TAACAATGTCTACATTAAGCTGGTGGGCACAGATGGGGAGAGTGATCGCACGTGGCTCATGGGCTTGAAAGGGGC
TTCATCCTTCGTGAGAGGAGCCGTATCAAAGTTTAAGGTGTCCTGCTCCACTTCCCTTGGAATCTTCTACTAAT
AGAGTTAGACAAACAGTCTCTCCCACTGTTCCAGAGGATGATTGGTTTTGTGCCAAGGTGGAAGTGAAATCCCC
TGAAGGAGACATCTACAATTTTCCCATCTACCGCTGGATTGCTGATAGCAAGGTGCACCGCTTTAAAGATGGAAA
AGCTCTGAAAGTCTTTGAAGACAACCATCATCTTGGCAGGTACAGTCGGCAGCAGGAGATTGAGCAGCGAGAGGA
AGACTATCGCTGGGATACATATGCAGAGGGAATACCTCACTCCTTGAAGGCACAAAACCAATTTTCTGCCATC
TGAGGTTTCAGTTCTCCTTCACCAAAACTACAGAGTTTCTCTACACTGCTTCCACAGGACTGACTGAGCTGAAGCT
GAAGGGACTGGATAACTGTAAGGAGAAGTGGGATAATATTGACGGCATCGATCGAGTGTTTTGCTGCAAAAAGAC
TGACATATCAGAATATGCTCAGGAACACTGGAAAGAGGATGCTTTCTTTGGCTACCAGTTTCTAAATGGTGTCAA
CCCCATTTTGATCCAGTGTTGTACAACCCTGCCAGTAACCTCCCTGTCACTGATGACATGGTCTTTCCCCGCAG
TCGTTGTCAGCCTTGAGATGAAATGAAGAAAGGGAACATATTCCTGTGTGACTACAAACTTCTGGATGGGGTGAA
AGCAAACACCATCAATGGGAAGAAGCAGTACTTGATGGCTCCTCTCGTCTGCTCCACAAATCTCTGACAATAA
ACTAATGCCGATTGCTATTGAGCTGAAGCAGACTCCATCAGATGACAATCCAATCTTTCTCTACTGATTCTGA
GTACGACTGGTTGATCGCCAAGATTTTTGTGAGAAGTGCAGATTTCAATCACCATCAGCTCAATGCTCACCTACT
GCGCACACATTTGCTGGCTGAGGTTTTTGCAGTGTCACTGCTGCGCAACCTGCCCATGGTGCATCCTCTGTACAA
GCTCCTCAAACCTCACACACGCTACACTCTGCAGATCAACTTCTTAGCTCGACGCCTTCTAATTTCTGAGATTGG
TGCTTTTCACTCAGTTTGCAGCATCAGGTGGAGAGGGCATGTTTACAATCCTGAAGAGGTGAGTGCTCTCAATGAC
CTACAGCTCCCTCTGTATAACAGATGACATTGCTGAACGTGGCCTAGAAGCTGTGCCAAACTTCTACTACAGAGA
TGATGGACTAAAGGTTTGGGATATCATCCACAGGTTTGTGCAGGGAATGCTCGGCTACTACTACAAGAGTGACAG
TGAGGTCCAGGAGGACTCTGAACCTCAGAAGTGGATTATGGACATTTTTGAACATGGATTCTTTTCTCAAGCAGA
AACAGGAATTCCTCAGACATTTACTTGTGTGACTGAGTTGGTCAAGTTTGTCAACATGGTGATCTTCACTTGCTC
AGCCCATGACATGCAGCCGTGAACCTCTGGACAGTATGACTATGGTGGCTGGATGCCCCAACCTCCCCTCTCCCTGCA
ACTCCC GCCACCCAGCACAAAGGGGACGACAAGCGAGGACGATGTTGGCCACCTTCCCTGACGCTCAATGTAAC
AGTTTCAGGGCATGGCCACCATGTGGCTACTCAGCAAGCAGTCCAGTGACTTTGTCCCTCTTGGCCAGTACCCGGA
GGAGCATTTCACTGAGGAGATTCTCGCAAAATACTCAAGGATTTTCAGATGGAGCTTGAAGATTTAAGTTTAGT
TATCAAAGGCAGAAACAAGCGTTTAGAAGTGCCATACACCTACATGGATCCGGCAGAGTTAGAAAAACAGTGTTGGC
CATTTGAATATTAGAAGACTCAGCTGTGAGACAAAATTCAGCTCCCTCTTCAAACAACAGCAGGGGAAAAGACCTCT
AATTTCTGACTTTTACTGATGAAATAGAACAAGAACTTACTGCTTATAATCACTATATACTAAACTGTAAAT
TTTATTCATCTGTGTTAAATGTAAATTTAATTTTTGATTACAATCTTGAATCATCTTCTGATTTTCATCATAGT
TTGCTATCCTATCAATAAAGAAGCGTCAAAGAAAAA
```

### ANEXO 2

Alineamiento de la secuencia de *Oreochromis niloticus* (O.NILOTICUS) con la secuencia obtenida en la investigación anterior (SEC.LIPOX). Marcado se observa el supuesto ATG, en la posición 94.

O.NILOTICUS	1	CTTGAAGATTTGAGTTTAGTCATCAGAGCCAGAAACAAGCGTTTAGAAGT	50
SEC.LIPOX	1	-----	0
O.NILOTICUS	51	GCCATACACCTACATGGATCCAGCACAGGATTTCAAGAGGAAAAATGGTG	100
SEC.LIPOX	1	-----	0
O.NILOTICUS	101	CAGTATAAAGTGACCGTATTCACTGGTGATCGCCTTAATTCCACTACTCT	150
SEC.LIPOX	1	-----	0
O.NILOTICUS	151	TAACAATGTCTACATTAAGCTGGTGGGCACAGATGGGGAGAGTGATCGCA	200
SEC.LIPOX	1	-----	0

<b>O.NILOTICUS</b>	201	CGTGGCTCATGGGCTTGAAAGGGGCTTCATCCTTCGTCAGAGGAGCCGTA	250
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	251	TCAAAGTTTAAGGTGTCCTGCTCCACTTCCCTTGAAATCTTCTACTAAT	300
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	301	AGAGTTAGACAAACAGTCTCTCCACTGTTCCCAGAGGATGATTGGTTTT	350
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	351	GTGCCAAGGTGGAAGTGAAATCCCCTGAAGGAGACATCTACAATTTTCCC	400
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	401	ATCTACCGCTGGATTGCTGATAGCAAGGTGCACCGCTTTAAAGATGGAAA	450
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	451	AGCTCTGAAAGTCTTTGAAGACAACCATCATCTTGGCAGGTACAGTCGGC	500
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	501	AGCAGGAGATTGAGCAGCGAGAGGAAGACTATCGCTGGGATACATATGCA	550
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	551	GAGGGAATACCTCACTCCTTGAAGGCACAAAACCAATTTTCTGCCATC	600
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	601	TGAGGTTGAGTTCTCCTTCACCAAACTACAGAGTTTCTCTACTGCTT	650
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	651	CCACAGGACTGACTGAGCTGAAGCTGAAGGGACTGGATAACTGTAAGGAG	700
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	701	AAGTGGGATAATATTGACGGCATCGATCGAGTGTGCTGCAAAAAGAC	750
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	751	TGACATATCAGAATATGCTCAGGAACACTGGAAAGAGGATGCTTCTTTG	800
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	801	GCTACCAGTTTCTAAATGGTGTCAACCCATTTTGATCCAGTGTGTACA	850
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	851	ACCCTGCCCAGTAACTTCCCTGTCACTGATGACATGGTCTTCCCCGCAG	900
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	901	TCGTTGCAGCCTTGCAGATGAAATGAAGAAAGGGAACATATTCCTGTGTG	950
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----	0
<b>O.NILOTICUS</b>	951	ACTACAACTTCTGGATGGGGTGAAAGCAAACACCATCAATGGGAAGAAG	1000
<b>SEC.LIPOX</b>	1	-----GTGAAAGCAAACACCATCAATGGAAAGAAG	30
<b>O.NILOTICUS</b>	1001	CAGTACTTGATGGCTCCTCTCGTCCTGCTCCACAAATCTCCTGACAATAA	1050
<b>SEC.LIPOX</b>	31	CAGTACTTGATGGCTCCTCTCGTCCTGCTCCACAAAACACAGATGATGA	80
<b>O.NILOTICUS</b>	1051	ACTAATGCCGATTGCTATTGAGCTGAAGCAGACTCCATCAGATGACAATC	1100
<b>SEC.LIPOX</b>	81	GCTGATGCCAATTGCTATTGAGCTGAAGCAGACTCCAGCAGAGGACAATC	130



<b>O.NILOTICUS</b>	1999	-GATGGAGCTTGAAGATTTAAGTTTAGTTATCAAAGGCAGAAACAAGCGT	2047
		.   .     .   .     .   .     .   .   .	
<b>SEC.LIPOX</b>	1030	GGA--GAGCTTAAAGTGTTAAGTGAAGCCATAAAAGTCAGAAACAAGAGC	1077
<b>O.NILOTICUS</b>	2048	TTAGAAGTGCCATACACCTACATGGATCCGGCAGAGTTAGAAAACAGTGT	2097
		.  .     .     .     .     .     .     .     .	
<b>SEC.LIPOX</b>	1078	CTGGAAGTTCCATACACATACATGGATCCAACGGAGGTAGAAAATAGTGT	1127
<b>O.NILOTICUS</b>	2098	GGCCATTTGAATATTAGAAGACTCAGCT-GTGAGACAAAATTCAGCTCCC	2146
		.     .   .	
<b>SEC.LIPOX</b>	1128	GGCCATTTGAA-----AATCAGGTGGTGT-----	1151
<b>O.NILOTICUS</b>	2147	TCTTCAAACAACAGCAGGGAAAGACCTCTAATTTCTGACTTTTACTGATG	2196
<b>SEC.LIPOX</b>	1152	-----	1151
<b>O.NILOTICUS</b>	2197	AAATAGAACAAAGAACTTACTGCTTATAATCACTATATATACTAAACTGT	2246
<b>SEC.LIPOX</b>	1152	-----	1151
<b>O.NILOTICUS</b>	2247	AAATTTTATTCATCTGTGTAAATGTAAATTTAATTTTGGATTACAATC	2296
<b>SEC.LIPOX</b>	1152	-----	1151
<b>O.NILOTICUS</b>	2297	TTGAATCATCTTCTGATTTTCATCATAGTTTGCTATCCTATCAATAAAGA	2346
<b>SEC.LIPOX</b>	1152	-----	1151
<b>O.NILOTICUS</b>	2347	AGCGTCAAAGAAAAA	2361
<b>SEC.LIPOX</b>	1152	-----	1151

## ANEXO 3

Alineamientos obtenidos del fragmento seleccionado de *O. niloticus* (Query) y el genoma de *D. labrax* (Sbjct), ordenado según el genoma de *D. labrax*.

### Range 2: 19830712 to 19830822

Query	82	TTCAAGAGGAAAAATGGTGCAGTATAAAGTGACCGTATTCCTGCTGATC--GCCTTAAT	139
Sbjct	19830712	TTCCAGAGCGAAAAATGGTGGATTATGAAGTGAGCATATTCCTGCGCATCTCGCCTT--T	19830769
Query	140	TCCACTACTCTTAACAATGTCTACATTAAGCTGGTGGGCACAGATGGGGAGAG	192
Sbjct	19830770	GCCTGCACTCTGAACTTGGTCAGCGTTAAGCTGGTGGGCACAGATGGGGAGAG	19830822

### Range 8: 19832634 to 19832783

Query	927	AGAAAGGGAACATATTCCTGTGTGACTACAAACTTCTGGATGGGGTGAAAGCAAACACCA	986
Sbjct	19832634	AGAAAGGCAACATATTCCTGTGTGACTACAAGCGTTTGGATGGAGTGAAAGCAAACACCA	19832693
Query	987	TCAATGGGAAGAAGCAGTACTTGATGGCTCCTCTCGTCCTGCTCCACAAATCTCCTGACA	1046
Sbjct	19832694	TCAATGGACAGAAGCAGTACTTGATGGCTCCTCTCGTCCTGCTCCACAAAACACCAGATG	19832753
Query	1047	ATAAACTAATGCCGATTGCTATTTCAGCTGA	1076
Sbjct	19832754	ATCAGCTGATGCCAATTGCTATTTCAGGTGA	19832783

### Range 12: 19833516 to 19833586

Query	1070	CAGCTGAAGCAGACTCCATCAGATGACAATCCAATCTTTCTTCCTACTGATTCTGAGTAC	1129
Sbjct	19833516	CAGCTGAAGCAGACTCCAGCAGATGACAATCCCGTCTTCTTCCTACTGATTCTGAGTAC	19833575

```
Query 1130      GACTGGTTGAT 1140
                |||||
Sbjct 19833576 GACTGGTTGAT 19833586
```

**Range 14: 19835276 to 19835306**

Query	1110	TTCCTACTGATTCTGAGTACGACTGGTTGAT	1140
Sbjct	19835276	TTCCTACTGATTCTGAGTACGACTGGTTGAT	19835306

**Range 1: 19849630 to 19849740**

Query	82	TTCAAGAGGAAAAATGGTGCAGTATAAAGTGACCGTATTCACTGGTGATCG--CCTTAAT	139
Sbjct	19849630	TTCCAGAGTGAAAATGGTGGATTATGAAGTGAGCATATTCACTGGCAATCGGGCCTT--T	19849687
Query	140	TCC-ACTACTCTTAAACAATGTCTACATTAAGCTGGTGGGCACAGATGGGGAGAG	192
Sbjct	19849688	GCCTAC-ACTTTTAAACATGTCTACATTAAGCTGGTGGGCACAGATGGGGAGAG	19849740

**Range 6: 19851252 to 19851421**

Query	759	CAGAAATATGCTCAGGAACACTGGAAAGAGGATGCTTTCTTTGGCTACCAGTTTCTAAATG	818
Sbjct	19851252	CAGACTATGTCCAGAAACATTGGAAGGAGGATGCTTTTTCGCGCTACCAGTTTCTAAATG	19851311
Query	819	GTGTCAACCCCATTTTGATCCAGTGTTGTACAACCCTGCCAGTAACTTCCTGTCACTG	878
Sbjct	19851312	GTGTCAACCCCATGTTGATCCGACGTTGTTTCAGCCCTGCCTGATAACTTTCCTGTACCG	19851371
Query	879	ATGACATGGTCTTTCCCGCA-G-TCGTTGCAGCCTTGCG-ATGAAATGAAG	928
Sbjct	19851372	ATGGCATGGTCGT-CCTC-CATGGTCAGTGTAGC-TTGAAGGATGAAATGAAG	19851421

**Range 10: 19851550 to 19851630**

Query	927	AGAAAGGGAACATATTCTGTGTGACTACAAACTTCTGGATGGGGTGAAAGCAAACACCA	986
Sbjct	19851550	AGAAAGGCAACATATTCTGTGTGACTACAAGCGTTTGGATGGAGTGAAAGCAAACACCA	19851609
Query	987	TCAATGGGAAGAAGCAGTACT	1007
Sbjct	19851610	TCAATGGGAAGAAGCAGTACT	19851630

**Range 11: 20417399 to 20417469**

Query	1070	CAGCTGAAGCAGACTCCATCAGATGACAAATCCAATCTTTCTTCCTACTGATTCTGAGTAC	1129
Sbjct	20417469	CAGCTGAAGCAGACTCCAGCAGATGACAAATCCCATCTTCTTCCTACTGATTCTGAGTAC	20417410
Query	1130	GACTGGTTGAT	1140
Sbjct	20417409	GACTGGTTGAT	20417399

**Range 7: 20418417 to 20418566**

[illegible]

#### Range 4: 20421956 to 20422013

Query	152	AACAATGTCTACATTAAGCTGGTGGGCACAGATGGGGAGAGTGATCGCACGTGGCTCA	209
Sbjct	20422013	AACAATGTCTTCATTAAGCTGGTGGGCACAGATGGGGAGAGTAAACGCACATGGCTCA	20421956

#### Range 13: 20431557 to 20431626

Query	1070	CAGCTGAAGCAGACTCCATCAGATGACAATCCAATCTTTCTTCCTACTGATTCTGAGTAC	1129
Sbjct	20431626	CAGCTGAAGCAGACTCCAGCAGAGGACAATCCCATCTTCTTCCTACTGATTCTGAGTAC	20431567
Query	1130	GACTGGTTGA	1139
Sbjct	20431566	GACTGGTTGA	20431557

#### Range 9: 20432324 to 20432486

Query	927	AGAAAGGGAACATATTCCTGTGTGACTACAAACTTCTGGATGGGGTGAAAGCAAACACCA	986
Sbjct	20432486	AGAAAGGCAACATATTCCTGTGTGACTACAAGCGTTGGATGGAGTGAAAGCAAACACCA	20432427
Query	987	TCAATGGGAAGAAGCAGTACTTGTATGGCTCCTCTCGTCTGCTCCACAAATCTCCTGACA	1046
Sbjct	20432426	TCAATGGAAAGAAGCAGTACTTGTATGGCTCCTCTCGTCTGCTCCACAAACACCAGATG	20432367
Query	1047	ATAAACTAATGCCGATTGCTATTTCAGCTGA-AGCAG-ACTCCA	1087
Sbjct	20432366	ATGAGCTGATGCCAATTGCTATTTCAGGTGAGATTAGCACTCCA	20432324

#### Range 5: 20432707 to 20432876

Query	759	CAGAATATGCTCAGGAACACTGGAAAGAGGATGCTTTCTTTGGCTACCAGTTTCTAAATG	818
Sbjct	20432876	CAGACTATGTCCAGGAACATTGGAATGAGGATGCTTTTTTTGGCTACCAGTTTCTAAATG	20432817
Query	819	GTGTCAACCCCATTTTGATCCAGTGTGTACAACCCTGCCAGTAACCTCCCTGTCACTG	878
Sbjct	20432816	GTGTCAACCCCATGTTGATCCGACGTTGTTTCAGCCCTGCCTGATAACTTTCCTGTCACTG	20432757
Query	879	ATGACATGGTCTTTCCCGCA-G-TCGTTGCAGCCTTGCAG-ATGAAATGAAG	928
Sbjct	20432756	ATGATATGGTCTT-CCTC-CATGGTCAATGTAGC-TTGGAGGATGAAATGAAG	20432707

#### Range 3: 20435127 to 20435273

Query	104	TATAAAGTGACCGTATTCCTGCTGATCGCCTT-AATCCACTACTCTTAACAATGTCTA	162
Sbjct	20435273	TATAAAGTGACAGTGTCCACTGTGCT-GCTGTGAGTCCACAACTTTTAACAATGTCTT	20435215
Query	163	CATTAAGCTGGTGGGCACAGATGGGGAGAGTGATCGCACGTGGCTCATGGGCTTGAAGG	222
Sbjct	20435214	CATTAAGCTGGTGGGCACAGATGGGGAGAGCGAACGCAAGTGGCTCATAGGCTTCAAAGG	20435155
Query	223	GGCTTCATCCTTCGTCAGAGGAGCCGTA	250
Sbjct	20435154	AGCTTCAGCCTTCGTGAGCGAGCGGTA	20435127



## ANEXO 4

Secuencias de interés para el diseño de primers del genoma de *D. labrax*.

### 1: 19830712 to 19830822

>secuencia1983

TTCCAGAGCGAAAATGGTGGATTATGAAGTGAGCATATTTCACTGGCGATCTCGCCTTTGCCTGCACTCTGAACTTGGTCA  
GCGTTAAGCTGGTGGGCACAGATGGGGAGAG

### 2: 19849630 to 19849740

>secuencia1984

TTCCAGAGTGAAAATGGTGGATTATGAAGTGAGCATATTTCACTGGCAATCGGGCCTTTGCCTACACTTTTAACCATGTCTACA  
TTAAGCTGGTGGGCACAGATGGGGAGAG

## ANEXO 5

Comparación de las dos secuencias de *D. labrax* en las que se podrían diseñar los primers.

<b>SEC.1984</b>	1	TTCCAGAGTGAAAATGGTGGATTATGAAGTGAGCATATTTCACTGGCAATC	50
		.                                 .	
<b>SEC.1983</b>	1	TTCCAGAGCGAAAATGGTGGATTATGAAGTGAGCATATTTCACTGGCGATC	50
<b>SEC.1984</b>	51	GGGCCTTTGCCTACACTTTTAACCATGTCTACATTAAGCTGGTGGGCACA	100
		..         .     .   ...   .. .	
<b>SEC.1983</b>	51	TCGCCTTTGCCTGCACTCTGAACCTGGTCAGCGTTAAGCTGGTGGGCACA	100
<b>SEC.1984</b>	101	GATGGGGAGAG	111
<b>SEC.1983</b>	101	GATGGGGAGAG	111

## ANEXO 6

Secuencia de *D. labrax* usada para el diseño de primers en la zona del supuesto ATG.

TTCCAGAGTGAAAATGGTGGATTATGAAGTGAGCATATTTCACTGGCAATCGGGCCTTTGCCTACACTTTTAACCA  
TGTCTACATTAAGCTGGTGGGCACAGATGGGGAGAG

## ANEXO 7

### F11

Name : F11  
Primer : 5'-TTCCAGAGTGAAAATGGTGGATT-3'  
Reverse : 3'-TTAGGTGGTAAAAGTGAGACCTT-5'  
Length : 23 nt

Tm (basic) : 64,0 °C  
Tm (salt) : 59,3 °C  
Tm (NN) : 58,3 °C

GC % : 39,1 %  
dG : -42,9 kCal/mol

3'-tail GC % : 42,9 %  
3'-tail dG : -9,7 kCal/mol

Molecular weight : 7204,7 g/mol

#### **F11 self annealing:**

5'-TTCCAGAGTGAAAATGGTGGATT-3'  
|||| : : :::  
3'-TTAGGTGGTAAAAGTGAGACCTT-5'  
dG: -5,07 kcal/mol

5'-TTCCAGAGTGAAAATGGTGGATT-3'  
::: : : |||  
3'-TTAGGTGGTAAAAGTGAGACCTT-5'  
dG: -2,35 kcal/mol

5'-TTCCAGAGTGAAAATGGTGGATT-3'  
||| : ::  
3'-TTAGGTGGTAAAAGTGAGACCTT-5'  
dG: -0,62 kcal/mol

5'-TTCCAGAGTGAAAATGGTGGATT-3'  
||| : ::  
3'-TTAGGTGGTAAAAGTGAGACCTT-  
5'  
dG: 1,02 kcal/mol

#### **F11 loops:**

5'-TTCCAGAGTGA  
|||| : )  
3'-TTAGGTGGTAAA  
dG: -4,65 kcal/mol

5'-TTCCAGAGT  
||| G  
3'-TTAGGTGGTAAAA  
dG: -1,93 kcal/mol

5'-TTCCAG  
||| )  
3'-TTAGGTGGTAAAAGTGA  
dG: -0,20 kcal/mol

5'-TTCCAGAGTGAAAATGG  
||| T  
3'-TTAGG  
dG: 1,44 kcal/mol

#### **R1154**

Name : R1154  
Primer : 5'-CCATCAAGTACTGCTTCTTTCC-3'  
Reverse : 3'-CCTTTCTTCGTCATGAACTACC-5'  
Length : 22 nt

Tm (basic) : 64,0 °C  
Tm (salt) : 60,3 °C  
Tm (NN) : 58,6 °C

GC % : 45,5 %  
dG : -41,3 kCal/mol

3'-tail GC % : 42,9 %  
3'-tail dG : -9,7 kCal/mol

Molecular weight : 6658,3 g/mol

**R1154 self annealing:**

5'-CCATCAAGTACTGCTTCTTTCC-3'  
                   :   | | | | |       :  
 3'-CCTTTCTTCGTCATGAACTACC-5'  
       dG: -6,69 kcal/mol

5'-CCATCAAGTACTGCTTCTTTCC-3'  
                   :   | | | : : : : :       :  
 3'-CCTTTCTTCGTCATGAACTACC-5'  
       dG: 0,22 kcal/mol

5'-CCATCAAGTACTGCTTCTTTCC-3'  
                   | | | :       : : : :  
       3'-CCTTTCTTCGTCATGAACTACC-5'  
       dG: 0,22 kcal/mol

**R1154 loops:**

5'-CCATCAAGTA  
                   :   | | | C  
 3'-CCTTTCTTCGT  
       dG: 0,64 kcal/mol

5'-CCATCAAGTACT  
                   | | | : )  
       3'-CCTTTCTTCG  
       dG: 0,64 kcal/mol

**F212**

Name               : F212  
 Primer             : 5'-AAATGGTGGATTATGAAGTGAGC-3'  
 Reverse            : 3'-CGAGTGAAGTATTAGGTGGTAAA-5'  
 Length             : 23 nt

Tm (basic)         : 64,0 °C  
 Tm (salt)          : 59,3 °C  
 Tm (NN)            : 57,7 °C

GC %               : 39,1 %  
 dG                 : -41,9 kCal/mol

3'-tail GC %       : 57,1 %  
 3'-tail dG         : -11,7 kCal/mol

Molecular weight : 7253,7 g/mol

**F212 self annealing:**

5'-AAATGGTGGATTATGAAGTGAGC-3'  
                   | | |       : : :  
 3'-CGAGTGAAGTATTAGGTGGTAAA-5'  
       dG: 1,02 kcal/mol

**F212 loops:**

5'-AAATGG  
                   | | | T  
 3'-CGAGTGAAGTATTAGG  
       dG: 1,44 kcal/mol

**R2176**

Name               : R2176  
 Primer             : 5'-TTGTGGAGCAGGACGAGAGG-3'  
 Reverse            : 3'-GGAGAGCAGGACGAGGTGTT-5'  
 Length             : 20 nt

Tm (basic)         : 64,0 °C  
 Tm (salt)          : 62,5 °C  
 Tm (NN)            : 64,0 °C

GC % : 60,0 %  
dG : -43,9 kCal/mol

3'-tail GC % : 71,4 %  
3'-tail dG : -11,6 kCal/mol

Molecular weight : 6349,1 g/mol

**R2176 self annealing:**

None!

**R2176 loops:**

None!